

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00813726.9

[51] Int. Cl.

*C07K 19/00 (2006.01)*

*C12N 15/62 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*A61K 38/20 (2006.01)*

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 37/04 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2006 年 1 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1235911C

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 35/00 (2006.01)*

*C07K 16/30 (2006.01)*

*C07K 14/52 (2006.01)*

*C07K 14/535 (2006.01)*

*C07K 14/54 (2006.01)*

*C07K 14/55 (2006.01)*

[22] 申请日 2000.8.9 [21] 申请号 00813726.9

[30] 优先权

[32] 1999.8.9 [33] US [31] 60/147,924

[86] 国际申请 PCT/US2000/021715 2000.8.9

[87] 国际公布 WO2001/010912 英 2001.2.15

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.1

[71] 专利权人 利思进药品公司

地址 美国麻萨诸塞州

[72] 发明人 S·D·吉利斯 劳健明

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 68 页 附图 19 页

[54] 发明名称

多细胞因子 - 抗体复合物

[57] 摘要

本发明涉及包括至少两种不同细胞因子分子的蛋白复合物和融合蛋白。所述蛋白复合物和融合蛋白还可以包括诸如免疫球蛋白区段的靶向部分。本发明还公开了使用所述蛋白复合物和融合蛋白的方法。

1. 一种多功能细胞因子-抗体融合蛋白，它包含免疫球蛋白区段和式 IL-12-X 的细胞因子融合蛋白，其中 X 是选自 IL-2、IL-4 和 GM-CSF 的第二细胞因子，并且 X 与异源二聚体或单链形式的 IL-12 的 p35 亚单位或 p40 亚单位的氨基末端或羧基末端共价相连；所述细胞因子融合蛋白通过其氨基末端与所述免疫球蛋白区段的羧基末端融合。

2. 权利要求 1 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中 IL-12 与所述细胞因子融合蛋白的第二细胞因子通过多肽接头融合。

3. 权利要求 1 或 2 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中所述免疫球蛋白区段与所述细胞因子融合蛋白通过多肽接头融合。

4. 权利要求 1 或 2 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中所述细胞因子融合蛋白中的第二细胞因子为 IL-2。

5. 权利要求 1 或 2 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中所述免疫球蛋白区段含有一个免疫球蛋白重链恒定区，所述免疫球蛋白重链恒定区包含铰链区结构域、CH2 结构域和 CH3 结构域。

6. 权利要求 5 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中所述免疫球蛋白区段为 Fc 区段。

7. 权利要求 5 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中所述免疫球蛋白区段还含有 CH1 结构域。

8. 权利要求 7 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中所述免疫球蛋白区段还含有 VH 结构域，所述 VH 结构域对癌症特异性抗原或病毒抗原具有免疫反应性。

9. 权利要求 8 的多功能细胞因子-抗体融合蛋白，其中所述免疫球蛋白区段还含有与免疫球蛋白重链联合的免疫球蛋白轻链，从而形成一个完整的抗体。

10. 编码权利要求 1-9 中任一项的多功能细胞因子-抗体融合

蛋白的核酸。

11. 含有权利要求 1-9 中任一项的多功能细胞因子-抗体融合蛋白的药用组合物, 任选还含有药用载体或赋形剂。

## 多细胞因子-抗体复合物

5

### 相关申请参考

本申请要求 1999 年 8 月 9 日申请的美国专利申请序号 60/147,924 的权益，美国专利申请序号 60/147,924 的公开内容通过引用结合到本文中。

10

### 发明领域

本发明涉及构建和表达多细胞因子蛋白复合物及其组合物的方法。更具体地讲，本发明涉及由多种细胞因子和一种靶向组分组成的融合蛋白，以及使用所述融合蛋白治疗如癌症和病毒感染的疾病的方法。

15

### 发明背景

控制免疫系统的调节网络依赖于称为细胞因子的分泌性蛋白信号分子开启和关闭免疫细胞的功能以及调节它们的增殖。这些反应一般涉及协调产生所需要的生物效应的多种细胞因子。某些细胞因子如白介素-2 (IL-2) 可以单独诱导免疫细胞增殖，并可以激活其它的功能，包括次级细胞因子分泌。另一种细胞因子白介素-12 (IL-12) [综述：Trinchieri, 1994, Blood 84: 4008-4027] 可诱导某些免疫细胞增殖，并可以诱导另一种关键免疫调节物 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )。这种对 IFN- $\gamma$  的诱导是 IL-12 的主要活性，但是 IL-12 具有其它重要的独立于 IFN- $\gamma$  的活性。因为 IL-12 本身是在感染性疾病的早期被诱导，所以认为 IL-12 是联系先天免疫系统和后天免疫系统的纽带。

25

对小鼠和人类免疫细胞的许多体外研究说明了细胞因子组合在产生最适免疫应答中的重要性。例如，大多数 T 细胞不表达 IL-12 受

体(IL-12R),直到它们被促细胞分裂原激活或高浓度 IL-2 下培养才表达该受体[Desai 等(1992), *J. Immunol.* 148: 3125-3132]。一旦表达 IL-12 受体,则所述细胞对 IL-12 的反应性要强得多。而且,IL-12 诱导 IFN- $\gamma$  转录,但此后不久 IFN- $\gamma$  mRNA 就被降解。在 IL-2 存在时, IFN- $\gamma$  mRNA 是稳定的,使产生的 IFN- $\gamma$  量急剧增加[Chan 等(1992) *J. Immunol.* 148: 92-98]。在其他研究中,发现 IL-3 + IL-11 或 IL-3 + 青灰因子的细胞因子组合与 IL-12 一起对早期造血祖细胞的增殖具有协同作用[以上引用的 Trinchieri, 1994]。IL-4 和 GM-CSF 组合对刺激树突细胞特别有用(Palucka 等[1998] *J. Immunology* 160: 4587-4595)。为了刺激细胞介导的免疫应答,还可使用 IL-12 与 IL-18 的组合,IL-18 是最近公开的一种具有某些 IL-12 互补活性的 Th1-促进型细胞因子(Hashimoto 等[1999] *J. Immunology* 163: 583-589; Barbulescu 等[1998] *J. Immunology* 160: 3642-3647)。另外,IL-2 与 IFN- $\gamma$  在某些情况下产生协同作用[Palladino, M.A., 美国专利第 5,082,658 号]。

在许多协同作用研究中,发现每种细胞因子的相对水平非常重要。尽管在存在次优量 IL-2 时加入 IL-12 在诱导增殖、溶细胞活性和 IFN- $\gamma$  诱导方面产生协同作用,但发现其中一种细胞因子使用高剂量的 IL-2 和 IL-12 组合是拮抗性的[Perussia 等, *J. Immunol.* 149: 3495-3502 (1992); Mehrotra 等, *J. Immunol.* 151: 2444-2452 (1993)]。IL-12 和 IL-7 组合也存在相似的情况。

IL-12 和其它细胞因子在小鼠中产生抗肿瘤反应的协同研究也显示混合性各种结果。在某些模型中,在每种细胞因子的次优剂量和导致毒性增强的较高剂量观察到协同作用,而在其它模型中,IL-12 和 IL-2 组合显示很小或没有协同作用[参见例如 Nastala 等, *J. Immunol.* 153: 1697-1706. (1994)]。这些结果可能反映出体内组合两种潜在协同因子的固有困难,尤其是当需要保持两种具有不同药理特性(如不同的循环半衰期和生物分布)的因子的固定活性比时。

在体外细胞培养实验中,可直接控制细胞因子水平,但许多因

素可以影响体内细胞因子的相对生物分布和定位，因此影响它们的免疫刺激能力。这些因素中最重要的是半衰期。在单次快速注射后 IL-2 的循环半衰期约为 10 分钟。与这些药代动力学特性显著不同的是，已经报道了 IL-12 在小鼠中的循环半衰期大于 3 小时 [Wysocka 等(1995) Eur. J. Immunol. 25: 672]，而在人体内的循环半衰期为 5-10 小时 [Lotze 等(1996) Ann NY Acad Sci 795: 440-454]。

这种差异被认为是由于 IL-2 和 GM-CSF 都相对较小(15-25 kD，而 IL-12 为 75 kD)，使得 IL-2 和 GM-CSF 可被肾过滤清除。分子量小于约 50 kD 的蛋白可被肾过滤清除。几乎所有的细胞因子都小于 50 kD，并存在相似快速的肾过滤清除。当需要用两种这样的被快速清除的小细胞因子治疗时，仅共同给予所述细胞因子就可以了。然而，共同给予对于半衰期显著不同的细胞因子并不是最优的。

难以系统给予细胞因子，因为它们具有有害的副作用。例如，高水平的  $\alpha$ -干扰素导致严重副作用，包括皮肤、神经、免疫和内分泌毒性。预期多细胞因子融合蛋白可能出现特别严重的副作用。

为减少系统给予细胞因子的副作用，一种策略是将一种细胞因子与第二种具有靶向能力的分子融合。其中 Fc 区位于另一种蛋白的 N 端的融合蛋白(称为‘免疫融合蛋白’或‘Fc-X’融合蛋白，其中 X 为配体，如  $\alpha$ -干扰素)具有许多与众不同的有利生物特性 [Lo 等，美国专利第 5,726,044 号和第 5,541,087 号；Lo 等，Protein Engineering 11: 495]。具体来说，这样的融合蛋白仍可以结合细胞表面上的相关 Fc 受体。然而，当所述配体结合细胞表面上的其受体时，Fc 区的取向改变，介导抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)和补体结合的序列似乎被封闭。结果，Fc-X 分子中的 Fc 区没有有效介导 ADCC 或补体结合。N 端细胞因子和 C 端 Fc 区的融合蛋白产生的细胞毒性作用是众所周知的。例如，IL-2 与 Fc 区的 N 端融合产生一种能够结合具有 IL-2 受体的细胞、结合补体并因此溶解细胞的分子 [Landolfi, N.F. (1993), 美国专利第 5,349,053 号]。相反，Fc-IL-2 融合蛋白不具有这

种特性。因此，预期 Fc-X 融合蛋白具有增加血清半衰期和肝中相对浓度的功效，而没有 ADCC 和补体结合的有害副作用。

已经证明，许多不同的短血清半衰期蛋白可以 Fc-X 构型与 Fc 区融合，获得的融合蛋白具有长得多的血清半衰期。然而，两种不同 Fc 融合蛋白的血清半衰期一般不相同。因此，当需要传递两种不同的 X 部分时，共同给予两种不同的 Fc-X 蛋白一般不是最优的。

在某些情况下，较好的方法是通过将细胞因子融合至对细胞表面抗原具有特异性和亲和性的抗体(或其衍生片段)(Gillies, 美国专利第 5,650,150 号; Gillies 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1428), 或通过肽键以融合蛋白形式使蛋白抗原和刺激性细胞因子连接(Hazama 等, Vaccine 11: 629), 将细胞因子的作用靶向细胞表面抗原。尽管抗体自身可增加融合细胞因子的半衰期, 但在和相同抗体融合的不同细胞因子融合蛋白之间仍存在差异[参见例如 Gillies 等, Bioconjugate Chem. 4: 230-235 (1993); Gillies 等, J. Immunol. 160: 6195-6203], 这种差异使得难以在靶位共同定位。如上所述, 这可以导致细胞因子活性不平衡, 降低所需要的协同作用。另外, 使用两种不同的融合蛋白需要分别测试每种融合蛋白的安全性和有效性分布, 然后作为混合物进一步测试。

## 20 发明概述

本发明提供两种或多种不同细胞因子的复合物或融合物, 它们可用于一般免疫治疗以及靶向免疫治疗。这些复合物或融合物可选地包括其它蛋白部分。所述复合物或融合物的一个特征在于它们提供细胞因子组分固定活性比。

25 一般而言, 本发明涉及含有至少两种不同细胞因子的蛋白复合物。所述细胞因子可位于同一多肽链中, 或者可通过共价键(如二硫键或化学交联形成的键)连接。或者, 所述细胞因子可为稳定的非共价键结合。在某些优选的实施方案中, 所述蛋白复合物包含在哺乳

动物中使所述复合物靶向特定部位的靶向部分，如抗体或抗体片段。

在一个优选的实施方案中，本发明提供将一种双链细胞因子(如 IL-12)的生物活性和第二种细胞因子的生物活性组合在一起的蛋白复合物。所述细胞因子互相之间可共价结合(例如融合)。所述细胞因子  
5 还可以通过其它部分结合。例如，含有第二种细胞因子的多肽链可包括特异性结合 IL-12 的结合部分，如 IL-12 抗体或 IL-12 受体。或者，所述结合部分可作用于结合 IL-12 的第二个部分。例如，如果编码 IL-12 亚单位的多肽链还包括抗生物素蛋白，则含有第二种细胞因子的多肽可包括作为靶向部分的生物素蛋白。在一个优选的实施方案中，所述第二种细胞因子为 IL-2。  
10

本发明提供制备 IL-12 融合蛋白的方法，所述融合蛋白既保持 IL-12 活性，也保持第二种细胞因子的活性，所述融合蛋白在提供一种类似于 IL-12 自身的更长的单一药代动力学特性的同时，延长第二种细胞因子的活性持续时间，并在注射入动物后保持两种细胞因子的活性平衡。  
15

在本发明的另一个实施方案中，所述融合蛋白包含异源二聚体形式的 IL-12，其中 IL-12 的 p35 和 p40 亚单位通过二硫键连接，并在 IL-12 的 p35 或 p40 亚单位的 N 端或 C 端与第二种细胞因子共价结合，通式为 IL-12-X 或 X-IL-12，其中 X 为第二种细胞因子。

在本发明的另一个实施方案中，所述融合蛋白包含与单链(sc)形式 IL-12 的 N 端或 C 端共价结合的第二种细胞因子，通式为 scIL-12-X 或 X-scIL-12，其中所述单链形式的 IL-12 包含两个通过柔性肽接头连接的多肽亚单位。  
20

在再一个实施方案中，两种细胞因子进一步融合至一种能够形成二聚体或多聚体结构的蛋白，融合部位在所述蛋白链的氨基端或羧基端。在该实施方案的一个优选形式中，IL-12 与第二种细胞因子的一种融合蛋白形式进一步融合至能够二聚体化的免疫球蛋白(Ig)链的一部分，如 Fc 区。进一步的实施方案包括在 Ig 链部分的任一端的  
25



至少一条 IL-12 多肽链和在另一端融合的第二种细胞因子的融合蛋白。

在另一个实施方案中，两种或多种细胞因子与因为结合特异性受体具有靶向能力的蛋白融合。例如，Fc 区能够结合肝脏富有的 Fc 受体。Fc 区与多种细胞因子的融合蛋白例证了二聚体和靶向的优势，但在某些情况下可构建仅具有多聚化能力或靶向能力但二者不同时具备的多种细胞因子的融合蛋白。

在再一个实施方案中，包含多种细胞因子的融合蛋白进一步在氨基端或羧基端与具有多种靶向能力的分子类型中的一种分子融合，所述分子例如为抗体或具有或不具有支架结构的适体 (aptamer)(Colas 等[1998] Proc Natl Acad Sci USA. 95: 14272-7)。一个具体的实施方案是多种细胞因子与能够结合抗原的抗体的至少一部分(如完整抗体、单链抗体或单链 Fv 区)的融合蛋白。其它的实施方案包括在能够结合抗原的至少一部分抗体链的任一端的至少一条 IL-12 多肽链与融合在另一端的第二种细胞因子的融合蛋白。

按照以上的描述，一般优选通过遗传工程技术使组成蛋白通过共价键(如酰胺键或二硫键)连接，构建多细胞因子融合蛋白和多细胞因子-抗体融合蛋白。但是，也可使用化学交联剂构建所述蛋白复合物。这样的方法在蛋白质化学领域是成熟的方法。另一方面，有时通过将不同的细胞因子与配偶体蛋白融合形成稳定非共价复合物就足以制得蛋白复合物。例如，使用一种非共价异源二聚体支持蛋白：第一种细胞因子融合至所述异源二聚体的一个亚单位，第二种细胞因子融合至所述异源二聚体的第二个亚单位，然后在合适的条件下混合两种融合蛋白。例如，在同一细胞中表达编码两种亚单位-细胞因子融合蛋白的核酸。因此，可构建其中组成细胞因子直接或间接非共价连接的多细胞因子蛋白复合物。为达到本发明的目的，所述复合物必须在给予动物时保持足够稳定并实现生物效应。

本发明还提供编码包含两种或多种细胞因子的融合蛋白的核

酸, 其中一种细胞因子优选为 IL-12, 而由所述核酸编码的融合蛋白  
可选地包括其它蛋白部分。优选的实施方案包括编码两种或多种细  
胞因子与二聚体蛋白(如抗体链的 Fc 部分)的融合蛋白的核酸。另一  
组优选实施方案为编码两种或多种细胞因子与具有靶向能力的蛋白  
5 (如抗体)的融合蛋白的核酸。

本发明还提供构建两种或多种细胞因子的融合蛋白的方法以及  
表达这样的融合蛋白的方法。

本发明还提供治疗疾病和其它病症的方法, 其中治疗包括两种  
或多种蛋白活性的有效组合。在一个实施方案中, 至少一种蛋白具  
10 有短血清半衰期(例如少于 20 分钟)或仅具有中等血清半衰期(例如少  
于 40 分钟)。通过遗传工程或其它技术融合所述蛋白并给予人或动  
物。因此, 两种蛋白的活性为固定活性比, 并且不需要按照两种蛋  
白的不同给药方案分别给予。另外, 融合蛋白的血清半衰期一般更  
近似于血清半衰期较长的蛋白组分的血清半衰期, 因此延长了血清  
15 半衰期较短蛋白的有效半衰期。

更具体地说, 本发明提供免疫治疗性治疗可用一种双链细胞因  
子(如 IL-12)和第二种细胞因子联合有效治疗的疾病(如癌症或感染或  
其它疾病)的方法。在一个优选实施方案中, IL-12 与 IL-2 或 GM-CSF  
融合并给予动物或人。在其它优选的实施方案中, GM-CSF 与 IL-4  
20 融合并给予动物或人。在另一个优选实施方案中, IL-12 与 IL-18 融  
合并给予动物或人。所述治疗可与其它疾病治疗联合使用。另外,  
本发明提供针对多种抗原的免疫方法, 所述方法可用于预防或治疗  
各种疾病。

在这些方法的其它实施方案中, 两种不同的细胞因子与二聚体  
25 蛋白部分(如抗体的 Fc 区)融合并给予动物或人。在这些方法的一个  
优选形式中, 细胞因子 IL-12 和第二种细胞因子与 Fc 区融合, 所述  
第二种细胞因子更优选 IL-2 或 GM-CSF。

在这些方法另外的其它实施方案中, 两种不同的细胞因子与完

整抗体融合，并给予动物或人。在这些方法的一个优选形式中，细胞因子 IL-12 和第二种细胞因子与抗体部分融合，所述第二种细胞因子更优选 IL-2 或 GM-CSF。本发明还公开了可用于治疗疾病的抗体-细胞因子融合蛋白混合物。在一个实施方案中，使用抗体-IL-2 融合蛋白与抗体-IL-12 融合蛋白的混合物治疗疾病。例如，治疗癌症、病毒感染或细菌感染。

### 附图简述

当同时阅读以下说明书和附图时，可更充分地理解本发明的前述目的和其它目的及其各种特征。

图 1A 图示说明两种细胞因子最简单形式的融合蛋白：一种细胞因子可选地通过接头与第二种细胞因子融合。图 1B-II 显示了其中第二种细胞因子(标记为 'cyt')可连接至异源二聚体细胞因子 IL-12 的各种方式。具体地说，第二种细胞因子可融合至 p40 的 C 端(图 1B)、p40 的 N 端(图 1C)、p35 的 C 端(图 1D)或 p35 的 N 端(图 1E)。另外，图 1 显示第二种细胞因子如何与单链型 IL-12 融合。具体而言，单链 IL-12 分子可为 p35 (N 端)至 p40，而第二种细胞因子在 C 端(图 1F)或 N 端(图 1G)。或者，单链 IL-12 分子可为 p40 (N 端)至 p35，而第二种细胞因子在 C 端(图 1H)或 N 端(图 1I)。

图 2A-2C 图示说明图 1 描述的多细胞因子融合蛋白(框形)进一步如何与抗体的 Fc 区(图中所示为铰链区(H)、CH2 结构域和 CH3 结构域(各种卵形))融合。具体而言，图 1 中的 8 种分子中的任一种均可与 Fc 区的 C 端(图 2A)或 N 端(图 2B)融合。另外，第一种细胞因子和第二种细胞因子(分别为框形)互相之间不需要直接连接，而可以通过 Fc 部分连接(图 2C)。

图 3A-3G 图解显示多细胞因子融合蛋白进一步与完整免疫球蛋白(如 IgG)融合的亚类方式。重链 V 区显示为卵形标记的  $V_H$ ，轻链 V 区显示为卵形标记的  $V_L$ ，而恒定区为空白卵形。图 1 例举的多细

胞因子融合蛋白可位于重链的 C 端(图 2A)、重链的 N 端(图 2B)、轻链的 N 端(图 2C)或轻链的 C 端(图 2D)。另外,有多种方式可将第一种和第二种细胞因子分别连接至重链和轻链的 N 端和 C 端;图 3E-3G 显示了其中的三种。

5 图 4A-4C 图解显示第一种细胞因子和第二种细胞因子如何与“单链”抗体融合,其中所述抗体的可变区轻链和可变区重链融合,并且所述蛋白以单一多肽表达,然后同源二聚体化。具体地说,多细胞因子融合蛋白可位于 C 端(图 4A)或 N 端(图 4B)。另外,第一种细胞因子和第二种细胞因子不需要直接连接,而可通过单链抗体部分  
10 连接(图 4C)。

图 5A-5C 图解显示第一种细胞因子和第二种细胞因子如何与单链 Fv 区(由重链和轻链的可变区融合组成)融合。具体地说,第一种细胞因子-细胞因子融合蛋白可位于 C 端(图 5A)或 N 端(图 5B)。另外,第一种细胞因子和第二种细胞因子不需要直接连接,而可通过单链 Fv  
15 部分连接(图 5C)。

图 6A 和 6B 显示在单独细胞因子或融合蛋白作用下,IL-12 和 IL-2 诱导人外周血单核细胞(PBMC)产生 IFN- $\gamma$  的协同作用。在图 6A 中,在植物凝集素活化之前(方形)或之后(X 形)用人 IL-12 处理细胞,或在植物凝集素活化之前(菱形)或之后(三角形)用 IL-12-IL-2 融合蛋白  
20 处理细胞。图 6B 显示其中细胞以 1: 1 摩尔比加入 IL-12 和 IL-2 的混合物(黑色菱形)、人 Fc-IL-12-IL-2 融合蛋白(灰色方块)和人抗体-IL-12-IL-2 融合蛋白(浅灰三角)处理的实验。X 轴表示 IL-12 的浓度(pg/ml),无论其是以完整蛋白存在还是以融合蛋白存在。y 轴表示应用 ELISA 测定的 IFN- $\gamma$  浓度(ng/ml)。

25 图 7 显示了分别检测融合蛋白活性并比较其与非融合 IL-12 分子活性的典型 IL-12 生物测定。所描述的是小鼠 IL-12(空白圆圈)、小鼠 IL-12 与以 1: 1 摩尔比加入的 IL-2 的混合物(黑色方块)、小鼠 IL-2(空白三角形)和抗体-小鼠 IL-12-IL-2 融合蛋白(黑色菱形)对人 PBMC

的  $^3\text{H}$ -胸苷摄取的刺激作用。X 轴表示单体细胞因子的浓度(pM), 无论其是以完整蛋白存在还是以融合蛋白存在; y 轴表示掺入氘化胸苷的 cpm。

5 图 8 显示标准的 IL-2 生物活性测定。曲线图显示小鼠 IL-2(圆圈)、抗体-小鼠 IL-12-IL-2 融合蛋白(菱形)和小鼠 IL-12(方块)对小鼠 CTLL 细胞增殖的刺激作用。X 轴表示单体细胞因子的浓度(pM), 无论其是以完整蛋白存在还是以融合蛋白存在。在含各种量的细胞因子或融合蛋白的培养基中培养细胞 48 小时, 然后使用 MTT/MTS 测定检测活细胞数。y 轴表示 490 nm 吸光度的光密度(OD)单位。

10 图 9 显示了小鼠 IL-12(空白圆圈)、小鼠 IL-12 与以 1: 1 摩尔比加入的 IL-2 的混合物(黑色圆圈)、小鼠 Fc-单链 IL-12-IL-2 融合蛋白(黑色三角形)和融合小鼠 IL-2 的小鼠单链 IL-12(黑色菱形)对人 PBMC 的  $^3\text{H}$ -胸苷摄取的刺激作用。x 轴表示单体细胞因子的浓度(pM), 无论其是以完整蛋白存在还是以融合蛋白存在; y 轴表示掺入氘化胸苷的 cpm。

15 图 10 显示了小鼠 IL-12(空白圆圈)、小鼠 IL-12 与以 1: 1 摩尔比加入的 GM-CSF 的混合物(黑色圆圈)、小鼠 GM-CSF(黑色三角形)和小鼠 Fc-小鼠 IL-12-GM-CSF 融合蛋白(X 形)对人 PBMC 的  $^3\text{H}$ -胸苷摄取的刺激作用。x 轴表示单体细胞因子的浓度(pM), 无论其是以完整蛋白存在还是以融合蛋白存在; y 轴表示掺入氘化胸苷的 cpm。

20 图 11 显示抗体-细胞因子-细胞因子融合蛋白治疗带有皮下肿瘤的 Balb/C 小鼠的功效, 所述皮下肿瘤由工程为表达人 EpCAM (KS-1/4 抗原)的 CT26 结肠癌细胞产生。黑色菱形表示在第 0、1、2、3 和 4 天注射 PBS 对照的小鼠肿瘤平均体积。三角形表示用 6  $\mu\text{g}$  KS-IL-12-IL-2 治疗的小鼠中的平均肿瘤体积。正方形表示用 3.4  $\mu\text{g}$  KS-IL2 和 5.3  $\mu\text{g}$  KS-IL12 治疗的小鼠中的平均肿瘤体积。进行肿瘤内注射。x 轴表示首次注射后经过的天数; y 轴表示平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

25 图 12. 显示抗体-细胞因子-细胞因子融合蛋白治疗带有皮下肿瘤

的 SCID 小鼠的功效,所述皮下肿瘤由工程为表达人 EpCAM 的 CT26 结肠癌细胞产生。菱形表示在第 0、1、2、3 和 4 天注射 PBS 对照的小鼠中的平均肿瘤体积。三角形表示用 6  $\mu\text{g}$  KS-IL-12-IL-2 治疗的小鼠中的平均肿瘤体积。正方形表示用 3.4  $\mu\text{g}$  KS-IL2 和 5.3  $\mu\text{g}$  KS-IL12 治疗的小鼠中的平均肿瘤体积。进行肿瘤内注射。x 轴表示首次注射后经过的天数; y 轴表示平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

图 13 显示抗体-细胞因子和抗体-细胞因子-细胞因子融合蛋白治疗带有皮下肿瘤的小鼠的功效,所述皮下肿瘤由工程为表达人 EpCAM 的 Lewis 肺癌(LLC)细胞产生。菱形表示在第 0、1、2、3 和 4 天肿瘤内注射 PBS 对照的小鼠中的平均肿瘤体积。正方形表示在第 0、1、2、3 和 4 天肿瘤内注射 20  $\mu\text{g}$  KS-IL2 的小鼠中的平均肿瘤体积。三角形表示在第 0、1、2、3 和 4 天肿瘤内注射 20  $\mu\text{g}$  KS-IL12 的小鼠中的平均肿瘤体积。X 形表示在第 0、1、2、3 和 4 天肿瘤内注射 20  $\mu\text{g}$  KS-IL-12-IL-2 的小鼠中的平均肿瘤体积。x 轴表示首次注射后经过的天数; y 轴表示平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

图 14 显示抗体-细胞因子-细胞因子融合蛋白对带有皮下肿瘤的小鼠的治疗功效,所述皮下肿瘤由工程为表达人 EpCAM 的 Lewis 肺癌细胞产生。菱形表示在第 0、1、2、3 和 4 天注射 PBS 对照的小鼠中的平均肿瘤体积。三角形表示用 20  $\mu\text{g}$  KS-IL-12-IL-2 治疗的小鼠中的平均肿瘤体积。正方形表示用 11.5  $\mu\text{g}$  KS-IL2 和 18  $\mu\text{g}$  KS-IL12 治疗的小鼠中的平均肿瘤体积。进行肿瘤内注射。x 轴表示首次注射后经过的天数; y 轴表示平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

图 15 显示抗体-细胞因子-细胞因子融合蛋白对带有皮下肿瘤的小鼠的治疗作用,所述皮下肿瘤由表达或不表达人 EpCAM 的 Lewis 肺癌细胞产生。黑色正方形表示带有 LLC-KSA 衍生肿瘤的小鼠中的平均肿瘤体积。黑色菱形表示带有 LLC 衍生肿瘤的小鼠中的平均肿瘤体积。在第 0、1、2、3 和 4 天用 20  $\mu\text{g}$  KS-IL12-IL2 治疗小鼠。进行肿瘤内注射。x 轴表示首次注射后经过的天数; y 轴表示平均肿瘤

体积( $\text{mm}^3$ )。

图 16 显示抗体-细胞因子-细胞因子融合蛋白对带有皮下肿瘤的小鼠的治疗功效, 所述皮下肿瘤由 Lewis 肺癌细胞产生。在第 0 天皮下注射约  $10^6$  细胞。菱形表示原初小鼠的平均肿瘤体积。正方形表示先前带有 Lewis 肺癌细胞(工程为表达人 EpCAM)产生的皮下肿瘤但已被 KS-IL12-IL2 治愈的小鼠中的平均肿瘤体积。x 轴表示首次注射后经过的天数; y 轴表示平均肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

图 17A 和 17B 显示肿瘤细胞分泌的单一细胞因子蛋白或多细胞因子蛋白对该细胞在免疫系统正常的动物中形成肿瘤能力的作用。在图 17A 中, 比较 4 组小鼠: 皮下注射  $1 \times 10^6$  LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(黑色菱形); 皮下注射  $5 \times 10^6$  LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(白色菱形); 皮下注射  $1 \times 10^6$  表达 scIL-12 的 LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(黑色三角形); 以及皮下注射  $5 \times 10^6$  表达 scIL-12 的 LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(白色三角形)。图 17B 比较了皮下注射  $1 \times 10^6$  LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(黑色菱形); 皮下注射  $5 \times 10^6$  LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(白色菱形); 皮下注射  $1 \times 10^6$  表达 scIL-12-IL-2 的 LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(X 形); 以及皮下注射  $5 \times 10^6$  表达 scIL-12 的 LLC 肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠(白色圆圈)。x 轴表示注射所述肿瘤细胞后的天数。y 轴表示肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

图 18 显示肿瘤细胞分泌的单一细胞因子蛋白或多细胞因子蛋白对该细胞在免疫缺陷型动物中形成肿瘤能力的作用。该图比较了皮下注射  $1 \times 10^6$  LLC 肿瘤细胞的 SCID 小鼠(黑色菱形); 皮下注射  $1 \times 10^6$  表达 scIL-12 的 LLC 肿瘤细胞的 SCID 小鼠(黑色三角形); 以及皮下注射  $1 \times 10^6$  表达 scIL-12 的 LLC 肿瘤细胞的 SCID 小鼠(白色圆圈)。x 轴表示注射所述肿瘤细胞后的天数。y 轴表示肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

### 发明详述

本发明提供其中两种或多种不同的细胞因子融合或复合的蛋白

分子。所述蛋白复合物或融合蛋白可选地包括其它的蛋白部分，包括具有多聚体化和靶向能力的部分，例如抗体 Fc 区和包括抗原结合部位的抗体区。本发明还提供编码多细胞因子融合蛋白的核酸。本发明还提供构建多细胞因子融合蛋白编码核酸的方法、产生多细胞因子融合蛋白的方法以及使用多细胞因子融合蛋白治疗疾病和病症的方法。

本文使用的“细胞因子”是指调节免疫系统细胞活性的分泌性蛋白或其活性片段或突变体。细胞因子的实例包括白介素、干扰素、趋化因子、肿瘤坏死因子、免疫细胞前体的集落刺激因子等。

10 本文使用的“异源二聚体细胞因子”是指由两种不同蛋白亚单位组成的细胞因子。IL-12 是目前唯一已知的天然异源二聚体细胞因子。但是，可构建人工异源二聚体细胞因子。例如，IL-6 和 IL-6R 可溶性片段可组合形成异源二聚体细胞因子，CNTF 和 CNTF-R  $\alpha$  同样可以构建异源二聚体[Trinchieri (1994) Blood 84: 4008]。

15 本文使用的“白介素-12” (IL-12)是指由 p35 和 p40 亚单位组成的两个亚单位细胞因子，或 p35 和 p40 的活性单链融合物，或其种变异体、片段或衍生物。

本文使用的“白介素-2” (IL-2)是指任何哺乳动物 IL-2，如人 IL-2、小鼠 IL-2 或其活性种变异体或等位基因变异体、片段或衍生物。

20 本文使用的“GM-CSF”是指哺乳动物粒细胞/单核细胞-集落刺激因子细胞因子蛋白，如人 GM-CSF、小鼠 GM-CSF 或其活性种变异体或等位基因变异体、片段或衍生物。

25 本文使用的“免疫球蛋白 Fc 区”是指免疫球蛋白重链恒定区的羧基端部分，或其类似物或部分。例如，IgG 的免疫球蛋白 Fc 区可包含至少一部分铰链区、CH2 结构域和 CH3 结构域。在一个优选的实施方案中，Fc 区包括至少一部分铰链区和 CH3 结构域。在另一个优选的实施方案中，Fc 区包括至少 CH2 结构域，更优选还包括至少一部分铰链区。



本文使用的“肽接头”是指用于将两种蛋白(例如一个蛋白和一个Fc区)偶联在一起的一个或多个肽。所述肽接头经常是一系列氨基酸,例如主要为甘氨酸和/或丝氨酸。所述肽接头最好是主要为甘氨酸和丝氨酸残基的混合系列,约10-15个氨基酸长度。

5 本文使用的术语“多聚(的)”是指两个或多个蛋白亚单位通过共价或非共价作用(例如二硫键连接)稳定结合。

本文使用的术语“二聚(的)”是指其中两个蛋白亚单位通过共价或非共价作用稳定结合的特定多聚分子。一种稳定复合物是解离速率至少几分钟的复合物,使得所述复合物在体内使用时稳定足够长时间,以到达靶组织并具有生物效应。Fc片段自身通常形成重链片段二聚体,所述重链片段包含一部分铰链区、CH2结构域和/或CH3结构域。然而,已知许多蛋白配体结合其二聚体受体。如果细胞因子X天然二聚化,则Fc-X分子中的X部分高得多的程度上二聚化,因为二聚体化过程是浓度依赖性的。由Fc连接的两种X部分的物理接近使二聚体化成为分子内过程,将平衡向有利于二聚体化的方向大幅移动,并增强了其与受体的结合。

15 本文使用的“载体”是指包含核苷酸序列的任何核酸,它能够掺入到宿主细胞中并与宿主细胞基因组重组和整合入其中,或能够作为附加体自主复制。这样的载体包括线性核酸、质粒、噬菌粒、粘粒、RNA载体、病毒载体等。病毒载体的非限制性实例包括反转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒。

20 本文使用的“基因表达”或“蛋白表达”是指DNA序列的转录、mRNA转录物的翻译以及蛋白产物的分泌或可分离形式的蛋白产物的产生。

25 本文使用的“免疫细胞因子”是如美国专利第5,650,150号公开的包含抗体和细胞因子的融合蛋白。

本文使用的“前导序列”是这样一种蛋白序列:它通常在N端与第二种蛋白序列连接,并引导细胞分泌第二种蛋白序列。前导序

列通常由第二种蛋白序列中切除，使所述蛋白成为成熟蛋白。术语“前导序列”一般与“信号序列”同义。

5 本文使用的“EpCAM”代表上皮细胞粘附分子(Cirulli 等[1998] 140: 1519-1534)，与“KSA”同义，是指单克隆抗体 KS-1/4 结合的抗原。EpCAM 是一种在上皮细胞衍生的癌细胞上丰富表达的细胞表面蛋白。

本文使用的“KS-1/4”是指结合 EpCAM 的特定单克隆抗体。

10 本文使用的“KS-IL2”、“KS-IL12”和“KS-IL12-IL2”等是指分别由 KS-1/4 与 IL-2、KS-1/4 与 IL-12 以及 KS-1/4 与 IL-12 和 IL-2 二者组成的抗体-细胞因子融合蛋白。本文还使用类似名称的融合蛋白构建物。因为细胞因子可能在几个位置融合在抗体分子上，所以诸如“KS-IL12-IL2”的描述是指包含在任何可能的位置与 IL-12 和 IL-2 二者融合的 KS-1/4 的蛋白类型，除非另外明确说明。

15 本文使用的“14.18”是指结合肿瘤特异性抗原 GD2 的特定单克隆抗体。

20 在图 1-5 中举例说明了数个体现本发明的说明性蛋白构建物实施方案。图 2-5 图示的分子组成部分标记为 1A-II，是指图 1A-II 所示的融合蛋白，说明图 1 的任何融合蛋白均可进一步融合至所示的其它蛋白。细胞因子以矩形表示，抗体恒定区以卵形表示，而重链可变区和轻链可变区以标记卵形表示。

25 本发明描述了包含两种不同细胞因子和可选地包括另外的蛋白部分的蛋白复合物。同源二聚体细胞因子(例如 $\alpha$ 干扰素、 $\beta$ 干扰素、 $\gamma$ 干扰素、IL-5、IL-8 等)尽管含有多个亚单位，但仍然是单个细胞因子。同样，异源二聚体细胞因子如 IL-12 尽管含有不同的亚单位，但也是单个细胞因子。而且，正常同源二聚体细胞因子的异源二聚体形式(如 MCP-1/MCP-2 异源二聚体)或正常同源二聚体细胞因子的两种等位基因的异源二聚体(例如 Zhang, *J. Biol. Chem.* [1994] 269: 15918-24)，也是单一细胞因子。本发明的复合物包含两种不同的细

胞因子, 其中每种细胞因子(例如 IL-2 和 IL-12; IL-4 和 GM-CSF; MCP-1 和 eotaxin 等)都能够调节免疫系统细胞的活性。

图 1A 描述了本发明的优选实施方案: 在融合蛋白 10 中, 第一种细胞因子 12 的 C 端可选地通过连接区(未显示)融合至第二种细胞因子 14 的 N 端。在本发明的某些实施方案中, 本发明的蛋白复合物包含至少两种血清半衰期显著不同的细胞因子。例如, 使用小蛋白和大蛋白通常导致融合蛋白具有较大蛋白的循环半衰期特征。因此, 在需要 IL-12 和第二种细胞因子的联合作用的情况下, 优选将两种细胞因子表达为以下通式的融合蛋白: IL-12-X 或 X-IL-12, 其中 X 为第二种细胞因子。观察到两种特别的优势。首先, 更快被清除的细胞因子的血清半衰期延长。第二, 两种细胞因子的血清半衰期互相之间变得非常相似。

诸如 IL-12 的双链细胞因子可在其任一条链的 N 端或 C 端与另一个细胞因子融合。在一个实施方案中, 第二种细胞因子融合在 IL-12 的 p35 或 p40 亚单位的 N 端或 C 端(图 1B-1E)。在图 1B 的融合蛋白 16 中, 第一种细胞因子 12 的 N 端融合至 IL-12 亚单位 p40 18 的 C 端。亚单位 p40 18 通过共价键 22 与 IL-12 亚单位 p35 20 连接。在图 1C 的融合蛋白 24 中, p40 亚单位 18 的 N 端融合至第一种细胞因子 12 的 C 端, 并通过共价键 22 与 p35 亚单位 20 连接。图 1D 描述了其中第一种细胞因子 12 的 N 端融合至 p35 亚单位 20 的 C 端的融合蛋白 26, p35 亚单位 20 通过共价键 22 与 p40 亚单位 18 连接。在图 1E 中, 融合蛋白 28 包括 p35 亚单位 20, 其 N 端融合第一种细胞因子 12 的 C 端, 并通过共价键 22 与 p40 亚单位 18 连接。

在第二个实施方案中, IL-12 亚单位可融合形成单链蛋白 scIL-12, 处于 N 端部位的或者为 p35 亚单位或者为 p40 亚单位; 第二种细胞因子可结合至产生的 scIL-12 的 N 端或 C 端(图 1F-1I)。因此, 在图 1F 描述的一个优选实施方案中, 融合蛋白 30 包含单链 IL-12, 其中 p40 亚单位 18 的 N 端可选地通过肽接头融合至 p35 亚单位 20

的 C 端。在该实施方案中，细胞因子 12 的 N 端融合至 p40 亚单位 18 的 C 端。在图 1G 显示的实施方案中，p35 亚单位 20 的 N 端可选地通过肽接头融合至细胞因子 12 的 C 端。图 1H 和 1I 显示了包含另一种单链型 IL-12 的融合蛋白 34 和 36，其中 p35 亚单位的 N 端可选地通过肽接头融合至 p40 亚单位的 C 端。在图 1H 显示的融合蛋白 34 中，细胞因子 12 的 N 端融合至 p35 亚单位的 C 端。在图 1I 显示的融合蛋白 36 中，p40 亚单位 18 的 N 端融合至细胞因子 12 的 C 端。在一个高度优选的实施方案中，IL-12 融合至 IL-2。

在实施例中进行进一步描述了这些分子的制备。

10 将异源多聚体分子如 IL-12 或抗体表达为其中不相同的亚单位通过短氨基酸接头连接的单链分子通常是很方便的 [Huston 等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879; Lieschke 等(1997) Nat Biotechnol. 15: 35; Lieschke; G.J.和 Mulligan; R.C., 美国专利第 5,891,680 号]。构建基因融合物，然后可以在包含单一重组 DNA 构建物的细胞中表达需要的蛋白。这样的单链型异源多聚体细胞因子可进一步融合至第  
15 二种细胞因子，这仍然允许由单一重组 DNA 构建物表达具有需要活性的融合蛋白。在实施例中描述了所述分子的表达。

本发明还描述了包含 IL-4 和 GM-CSF 的融合蛋白。该组合在功能性刺激树突细胞提呈抗原方面特别有用。另一种有用的融合蛋白  
20 包含 IL-12 和 IL-18。这些细胞因子都促进 Th1 应答，但互补活性稍有不同。

本发明还描述了其中多种不同的融合细胞因子进一步融合至能够形成多聚体(如同源二聚体或异源二聚体)的蛋白的融合蛋白。这种分子的优势在于二聚体化可增强一种或多种细胞因子的效力。在某些情况下，二聚化对效力的增强可能因为细胞因子结合其二聚体受体。在一个实施方案中，多种细胞因子融合至抗体分子的一部分，如 Fc 区(图 2)。在另一个实施方案中，IL-12 和第二种细胞因子融合至同源二聚化蛋白部分。在一个优选的实施方案中，所述第二种细  
25

胞因子为 IL-2 或 GM-CSF。所述融合蛋白可以各种方式产生，反映  
几种不同蛋白部分由融合蛋白的 N 端至 C 端的所有不同排序。例如  
当 IL-12 和第二种细胞因子融合至 Fc 区时，两种细胞因子都可以任  
何顺序融合至 Fc 区的 N 端或 C 端，或者一种细胞因子可融合在 N  
5 端，而另一种细胞因子融合在 C 端。

在图 2 描述了一些这样的排列。例如，在图 2A 所示的实施方案  
中，本发明的融合蛋白 44 融合至含有铰链区 38、CH2 区 40 和 CH3  
区 42 的 Fc 区的 C 端。融合蛋白 44 可具有各种结构，包括例如图 1A-II  
中描述的融合蛋白 10、16、24、26、28、30、32、34 或 36 的结构。  
10 如果融合蛋白 44 如同融合蛋白 16、24、26 和 28 一样具有一个以上  
的 N 端和 C 端，则 Fc 区可融合至融合蛋白 44 的任一个 N 端。如图  
2B 所示，融合蛋白 44 可融合至 Fc 区的 N 端。在图 2C 所示的实  
施方案中，第一种细胞因子 12 可融合至 Fc 区的 N 端，而第二种细胞  
因子 14 可融合至 Fc 区的 C 端。

15

### 结构设想

要着重指出的是，细胞因子作为一类蛋白质，在大小和一般折  
叠特性上是相似的。因此，本文公开的具体实施例描述了如何构建  
细胞因子蛋白家族的多细胞因子融合蛋白。例如，许多细胞因子属  
于称为“四螺旋束”的蛋白折叠类型。四螺旋束蛋白包括粒细胞集  
20 落刺激因子(G-CSF)、白介素 6 (IL-6)、白血病抑制因子(LIF)、生长  
激素、睫状神经营养因子(CNTF)、苗条蛋白、促红细胞生成素、粒  
细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素 5 (IL-5)、巨噬细胞  
集落刺激因子(M-CSF)、IL-2、IL-4、白介素 3 (IL-3)、IL-10、 $\beta$ 干扰  
25 素、 $\alpha$ 干扰素和密切相关的 $\tau$ 干扰素以及 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )。

除了 IL-5 和 IFN- $\gamma$ 以外，所有这些蛋白都折叠为具有四个大致  
平行的 $\alpha$ 螺旋和两个交叉连接的单体。在除了 IL-5 和 IFN- $\gamma$ 以外的每  
种情况下，N 端和 C 端都在所述蛋白的同一面。因为 IL-5 和 IFN- $\gamma$

以外的四螺旋束蛋白都具有相同的折叠模式，本文描述的用于 IL-2、IL-4 和 GM-CSF 的方法也适用于其它四螺旋束蛋白和其它的折叠为单体的细胞因子小蛋白。

趋化因子是一类特殊的细胞因子，人们认为其形成胞外梯度和介导特定类型免疫细胞的趋化性。例如，MCP-1 是单核细胞、巨噬细胞和活化 T 细胞的化学引诱物；eotaxin 是嗜酸性粒细胞的化学引诱物；而 IL-8 是嗜中性粒细胞的化学引诱物。趋化因子除了其化学引诱物功能以外，同其它细胞因子一样，也能够诱导特定基因在特定的靶细胞中表达。例如，认为 MCP-1 在血管平滑肌细胞中诱导组织因子表达(Schechter 等, J Biol Chem. [1997] 272: 28568-73)。

本发明公开了其中一种或多种细胞因子为趋化因子的细胞因子-细胞因子融合蛋白和抗体-细胞因子-细胞因子融合蛋白。本发明还公开了具有三种或三种以上的细胞因子的蛋白构建物，其中一种或多种细胞因子为趋化因子。例如，趋化因子 IP-10、RANTES、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、巨噬细胞趋化蛋白、eotaxin、淋巴趋化因子(lymphotactin)、BLC 可融合至有或没有其它部分(如抗体部分)的第二种细胞因子。

例如人基因组编码至少 50 个趋化因子。已知的趋化因子一般具有相似的三维单体结构和蛋白折叠模式。因此，本文公开的一般类型的蛋白构建物和构建策略可适用于各种已知的趋化因子和迄今尚未发现的趋化因子。

趋化因子具有一种独特的含三个 $\beta$ 链和一个 $\alpha$ 螺旋的折叠模式。在某些但不是所有情况下，趋化因子折叠为单体，然后在折叠后二聚化。对于所有的趋化因子，单体亚单位的折叠模式相同，整体结构极其相似。例如，IL-8、血小板因子 4、黑素瘤生长刺激因子(MGSA)、巨噬细胞炎性蛋白、MIP、RANTES(受激活作用调节的正常 T 细胞表达和分泌的蛋白)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1、MCAF)、Eotaxin、单核细胞趋化蛋白-3 (MCP-3)、fractalkine 趋化因子结构域、嗜中性白细胞活化肽-2(NAP-2)、基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、巨噬细胞炎

性蛋白-2、趋化因子 hcc-2(巨噬细胞炎性蛋白-5)、Gro  $\beta$ 、细胞因子诱导性嗜中性白细胞化学引诱物和 CINC/Gro 的三维结构已通过 X 射线晶体学和/或 NMR 方法测定;所有这些结构都显示相同的折叠和广泛的相似。因为趋化因子具有相同的折叠模式,所以本文描述的用于淋巴趋化因子的方法也适用于其它趋化因子蛋白。

趋化因子的自由 N 端对其功能通常很重要。因此,在某些实施方案中可优选构建其中第二种细胞因子、抗体部分或其它蛋白部分与趋化因子 C 端融合的融合蛋白。为了构建含有两种活性趋化因子的蛋白复合物,例如将两种不同趋化因子融合至抗体重链和轻链的 N 端是有效的。某些趋化因子如 IL-8 在生理条件下为二聚体。对于某些用途,有效的作法是共表达多细胞因子抗体融合蛋白(如 IL-8-抗体-细胞因子融合蛋白)以及未融合的 IL-8 部分或具有不与抗体部分相互作用的不同融合配偶体的 IL-8 部分。因此,不同的 IL-8 部分可异源二聚化而没有在所有的 IL-8 部分都融合至抗体链时可能导致的空间约束或多聚化。然后可根据大小或根据与抗体结合蛋白(如葡萄球菌 A 蛋白)的结合分离需要的多细胞因子融合蛋白。

对于含有趋化因子的多细胞因子融合蛋白,一个优选的实施方案为所述融合蛋白还包含定位功能,如结合抗原的抗体部分。尽管希望不受理论的束缚,但是一般认为趋化因子在体内的广泛分布将失去作用或导致细胞对所述趋化因子全面脱敏。另外,认为趋化因子的化学引诱物功能仅可以在所述趋化因子存在浓度差时才能表现出来。

一个优选的实施方案是淋巴因子-抗体-IL-2 融合蛋白。另一个优选的实施方案是其中趋化因子和第二种细胞因子都促进 Th1 应答的融合蛋白。例如,含有 IP-10 和 IL-12 的融合蛋白是一个高度优选的实施方案。

### 延长血清半衰期短的多细胞因子的半衰期

本发明还描述了含有两种细胞因子的融合蛋白，所述两种细胞因子的血清半衰期均短，并融合至血清半衰期长的第三部分。例如，当需要刺激树突细胞时，有效的做法是将 IL-4 和 GM-CSF 活性组合在一起(Thurner, J Immunol. Methods [1999] 223: 1-15; Palucka 等, [1998] J Immunol. 160: 4587-4595)。因为 IL-4 和 GM-CSF 都是血清半衰期短的小分子，所以构建含有 Fc 区、IL-4 和 GM-CSF 的融合蛋白是有用的。得到的分子是树突细胞增殖和活性的强刺激物。同样地，IL-4 和 GM-CSF 都可以融合至靶向组分(如抗体)，以便将组合的细胞因子活性传递至表达预定抗原的细胞部位。

单独的 Fc 区或作为完整抗体组成部分的 Fc 区，可以赋予多细胞因子融合蛋白几种特性，这些特性可能是有利的或是不利的，取决于具体的用途。这些特性包括二聚体化、延长血清半衰期、结合补体的能力、介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力以及 Fc 受体结合。如果血清半衰期延长是主要需要的特征，并且 Fc 区的免疫特性是不重要或不需要的，则优选使用缺乏一种或多种免疫特性的 Fc 区天然变体或突变体。例如，如果需要均等或延长两种或多种血清半衰期短的细胞因子的血清半衰期，则优选构建含有人 IgG2 或 IgG4 的 Fc 区的多细胞因子融合蛋白，所述人 IgG2 或 IgG4 的 Fc 区各自对 Fc 受体的亲和力降低或消失，或者优选使用在 Fc 受体结合位点具有突变的 Fc 区。实际上，已经表明某些细胞因子与抗体的融合蛋白增加了所述融合蛋白对 Fc 受体的亲和性，导致其在动物体内的清除速率更快。使用对 Fc 受体亲和力降低的 Fc 区极大改善这些分子的血清半衰期(Gillies 等[1999] Cancer Res. 59: 2159-2166)。在某些情况下并取决于所使用的细胞因子，结合 Fc 受体的 Fc 区导致多细胞因子融合蛋白内化和一种或多种细胞因子部分的降解。



## 靶向

本发明还描述了其中两种或多种细胞因子连接到能够将所述细胞因子定位到特定靶分子、细胞或机体部位的蛋白的融合蛋白。优选的具有定位能力的分子为抗体或含有抗原结合可变区的抗体部分。然而，可以使用其它定位分子或其结构域，诸如特异性配体或受体、天然存在的结合蛋白、结合特定底物的酶、经选择特定结合或定位能力的人工制备肽、具有产生靶向能力的特殊物理-化学特性的肽、因为与另一个靶向分子结合而具有靶向能力的蛋白或其它类型的蛋白。在融合两种细胞因子至靶向分子的情况下，优选的第一种细胞因子为 IL-12。当使用 IL-12 时，优选的第二种细胞因子为 IL-2 或 GM-CSF。

在使用抗体的情况下，存在无数可将两种或多种细胞因子融合的方式，因为存在若干可能的连接部位。例如，IgG 抗体由两个重链和两个轻链组成。两种细胞因子可互相融合，然后融合至重链或轻链中任一条链的 N 端或 C 端。或者，每种细胞因子可分别融合至所述抗体分子上的一个 N 端或 C 端。

图 3 描述了一部分可将两种细胞因子融合至抗体分子的方法。例如，参照图 3A，本发明的融合蛋白 44 可融合至免疫球蛋白重链 46 的 C 端，而免疫球蛋白重链 46 与免疫球蛋白轻链 48 相连。如图 2 所示，融合蛋白 44 可具有许许多多的结构，包括例如图 1A-II 中描述的融合蛋白 10、16、24、26、28、30、32、34 或 36 的结构。如图 3B 所示，融合蛋白 44 可融合至与免疫球蛋白轻链 48 相连的免疫球蛋白重链 46 的 N 端。在图 3C 和 3D 显示的实施方案中，融合蛋白 44 融合至与免疫球蛋白重链 46 相连的免疫球蛋白轻链 48 的 N 端(图 3C)或 C 端(图 3D)。如图 3E 和 3F 所示，第一种细胞因子 12 可融合至免疫球蛋白轻链 48，而免疫球蛋白轻链 48 与融合第二种细胞因子 14 的免疫球蛋白重链 46 相连。细胞因子 12 和 14 可融合至免疫球蛋白链的 N 端(图 3E)或 C 端(图 3F)。或者，如图 3G 所示，第

一种细胞因子 12 可融合至免疫球蛋白轻链 48 的 N 端，而第二种细胞因子 14 融合至免疫球蛋白重链 46 的 C 端。

### 与单链抗体融合

5 将抗体表达为单链抗体有时是非常适合的。本发明还提供其中两种或多种细胞因子融合至单链抗体的融合蛋白。其优势是在表达特别用于基因治疗的需要的融合蛋白时减少了使用的 DNA 构建物数。具体地说，如果所述细胞因子为单链分子，则其与单链抗体的融合将允许所述融合蛋白以单一蛋白链表达。

10 如图 4A-4C 所示，在某些实施方案中，细胞因子可融合至单链抗体的 N 端、C 端或两端。例如，如图 4A 所示，融合蛋白 44 可融合至具有轻链可变区 52 和重链可变区 54 的单链抗体 50 的 C 端。如图 4B 所示，融合蛋白 44 也可融合至单链抗体 50 的 N 端。在图 4C 显示的实施方案中，第一种细胞因子 12 融合至单链抗体 50 的 N 端，  
15 而第二种细胞因子融合至单链抗体 50 的 C 端。

一个优选的实施方案包含 IL-12 和第二种细胞因子与单链抗体的融合蛋白。一个更优选的实施方案包含作为第二种细胞因子的 IL-2 或 GM-CSF。

20 抗体的恒定区具有介导各种效应子功能的潜能。例如，IgG1 介导补体结合、ADCC 和与 Fc 受体的结合。所述细胞因子融合的位置可改变抗体恒定区的效应子功能，这在需要调节这些效应子功能时是有用的。

25 在某些情况下，可能需要构建两种或多种细胞因子与具有抗体靶向区但不具有恒定区的部分的融合蛋白。这样的融合蛋白小于完整抗体与两种或多种细胞因子的融合蛋白，这可能在某些用途上具有优势。另外，这样的融合蛋白缺少完整抗体的一种或多种效应子功能，但仍保留抗体的靶向能力。

因此本发明的特征在于其中两种或多种细胞因子融合至单链 Fv

区的融合蛋白。如图 5A-5C 描述的实施方案所示, 两种细胞因子可融合至 Fv 区的 N 端或 C 端, 或者一端融合一种细胞因子。例如, 如图 5A 所示, 本发明的融合蛋白 44 可融合至含有免疫球蛋白轻链可变区 52 和免疫球蛋白重链可变区 54 的单链 Fv 区的 C 端。融合蛋白 44 还可以融合至示于图 5B 的 Fv 区的 N 端。如图 5C 所示, 第一种细胞因子 12 可融合至 Fv 区的 N 端, 而第二种细胞因子 14 可融合至 Fv 区的 C 端。

### **作为多细胞因子异源二聚体载体的抗体**

在某些情况下, 需要构建两种或多种细胞因子的融合蛋白, 其中对于两种所述细胞因子而言, 所述蛋白的同一末端是其活性必须的。例如, 两种不同的细胞因子的天然存在的 N 端对每种细胞因子的活性都可能是必不可少的。不可能构建其中两种细胞因子部分都有活性的单一多肽链融合蛋白。

抗体为由重链和轻链组成、通过二硫键共价连接的异源二聚体蛋白。如果需要构建具有两种细胞因子部分(都需要完整的非融合 N 端)的多细胞因子融合蛋白, 最好将所述两种细胞因子分别融合至抗体重链和轻链的 N 端(图 3E)。同样地, 如果需要构建具有两种细胞因子部分(都需要完整的非融合 C 端)的多细胞因子融合蛋白, 最好将所述两种细胞因子分别融合至抗体重链和轻链的 C 端(图 3F)。如果所述抗体仅用作以此方式连接两种细胞因子的载体, 则突变或去除所述抗体的那些具有其它免疫功能相关特性的部分可能有用。例如, 可优选使用 Fab 区作为载体, 因为 Fab 区保留了抗体的异源二聚体特征但缺少 Fc 区的功能特征。使用其中抗原结合部位无功能的抗体或抗体片段也可能有用。

多种细胞因子与抗体的融合蛋白兼有多种本发明的新特征。在抗体-多细胞因子融合蛋白中, 所述细胞因子的血清半衰期均等或延长; 两种细胞因子的活性局限于靶, 并避免了由于系统给予多种协

同作用的细胞因子而产生的特别毒性作用；各细胞因子有效二聚化或多聚化；所述细胞因子不需要直接融合但可以融合至抗体分子重链和轻链上的不同部位。

5 在设计含有多种细胞因子和一种抗体的融合蛋白时，存在许多可通过常规实验方法区分的选择和构型。结构性生物学设想也是有用的。例如，许多细胞因子属于叫做 4 螺旋束的一类。这些结构由 4 个 $\alpha$ 螺旋组成，并且 N 端和 C 端在同一邻近位置。一般而言，细胞因子在 N 端和 C 端周围的一面不用于结合细胞因子受体，所以任一端都可用于和抗体或第二种细胞因子融合。然而，有时由于空间原因难以直接将 4 螺旋束细胞因子的 N 端和 C 端融合至不同的部分。因此，当需要将两种不同的 4 螺旋束细胞因子融合至抗体时，有效作法是将每种细胞因子融合至所述抗体上的不同部位。或者，如果必须构建 Ig 链-细胞因子-细胞因子形式的多肽链，则可使用一种或多种柔性接头克服空间问题。

10 还可能使用其它分泌性异源二聚体分子代替抗体来携带多种细胞因子。例如，可使用包括前列腺特异性抗原和与其复合的蛋白酶抑制剂的复合物、IgA 重链和 J 链、TGF- $\beta$ 家族成员及其虾红素样结合配偶体或 IL-12。

## 20 核酸

本发明的特征还在于能够表达上述每种类型蛋白的核酸。这些核酸包括含两种或多种细胞因子的融合蛋白的编码核酸、含两种或多种细胞因子以及二聚体化结构域(如 Fc 区)的融合蛋白的编码核酸、含两种或多种融合至抗体的细胞因子的融合蛋白的编码核酸以及含两种或多种融合至 Fc 区的细胞因子的融合蛋白的编码核酸。优选形式的核酸为可在细菌和哺乳动物细胞中表达融合蛋白的 DNA 载体。对于含多条多肽链的融合蛋白，可使用一个以上的编码核酸。或者，可将两种或多种融合蛋白编码序列置于单一核酸分子上。实施例描

述了编码多细胞因子的特征核酸的具体形式。

本发明的核酸特别用于表达多细胞因子融合蛋白，或用于产生这些蛋白或用于基因治疗目的。

5 在实施例中描述了合成本发明有用实施方案的方法，以及用于测试其药理学活性的测定。

本发明还提供药用组合物及其用于治疗 and 预防各种疾病(包括但不限于治疗各种感染和癌症)的方法，以及针对各种疾病的疫苗接种。

10 多细胞因子融合蛋白可用于治疗细菌、寄生物、真菌或病毒感染，或者用于治疗癌症。例如，已知 IL-12 在许多类型的感染中具有保护作用，所述感染包括但不限于细菌单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)感染；寄生物鼠弓形体(*Toxoplasma gondii*)、硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)和曼氏裂体吸虫(*Schistosoma mansoni*)感染；真菌白色念珠菌(*Candida albicans*)感染；以及病毒脉  
15 络丛脑膜炎病毒和巨细胞病毒感染。因为细胞因子一般联合起作用，故使用含两种或多种已知协同起作用的细胞因子常常是有用的。例如，因为 IL-2 增强 IL-12 的作用，所以在治疗细菌、寄生物、真菌和病毒感染性疾病时组合这些细胞因子是有用的。

20 治疗感染性疾病的一个优选方法是使用进一步融合至靶向剂的多细胞因子融合蛋白，所述靶向剂将所述多种细胞因子靶向感染部位。以下描述各种靶向策略。

25 可使用固体、半固体或液体剂型的本发明药用组合物，例如丸剂、胶囊剂、粉末剂、液体制剂、悬浮剂等，优选适用于准确剂量给予的单位剂型。所述组合物包括常规药用载体或赋形剂，以及另外可包括其它医疗药物、药用剂、载体、佐剂等。这样的赋形剂可包括其它蛋白，例如人血清白蛋白或血浆蛋白。制备所述剂型的实际方法是已知的，或者是对本领域技术人员而言显而易见的。要给予的组合物或制剂在任何情况下都含有一定量的活性组分，其量可有效在受治疗患者体内实现治疗作用。

关于所述组合物的给予，可通过任何已接受的给予模式，以使所给予的药物具有所述活性。这些给药方法包括口服、胃肠外或局部给予以及其它的系统形式，注射是优选的给予方法。

5 当然，给予活性化合物的量取决于要治疗的患者、病患的严重程度、给予方式和主治医师的判断。

如上所述，已经研究了细胞因子如 IL-2、IL-12、GM-CSF、IL-4 和其它一些细胞因子在治疗癌症方面的作用。在某些情况下，使用多细胞因子融合蛋白治疗癌症是有利的，原因是给予较简单、增加了一种组成细胞因子的血清半衰期和/或良好调节两种细胞因子的相对活性。

10 治疗癌症的一个优选方法是将细胞因子靶向特定的器官和组织，因此可集中细胞因子的功效，并可避免系统分布的副作用。例如，期望多种细胞因子和 Fc 区的融合蛋白集中于肝脏，这对于治疗局限于肝脏的癌症有利。一个更优选的方法是使用进一步融合至靶向剂(如抗体)的多细胞因子融合蛋白。具体地说，抗体 KS-1/4 和 14.18 针对肿瘤特异性抗原(Varki NM 等, Cancer Res [1984] 44: 681-7; Gillies 等, Journal of Immunological Methods 125: 191 [1989]; 美国专利第 15 4,975,369 号和第 5,650,150 号)。当使用抗体-多细胞因子融合蛋白时，常常需要分析肿瘤类型和选择针对可能存在于所述类型肿瘤上的抗原的抗体。例如，可通过 FACS 分析、蛋白质印迹、检测肿瘤 DNA 20 或仅鉴定肿瘤细胞类型，特征鉴定肿瘤。这样的肿瘤表征方法是肿瘤表征领域技术人员(如肿瘤学家和肿瘤生物学家)众所周知的。还可通过多种其它方法靶向多细胞因子融合蛋白，如与特异性配体或受体部分融合、与具有预先选定的结合活性的肽适体融合、与具有定位特性的小分子化学结合等等。这些靶向方法还可用于治疗其它疾 25 病，如感染。

### 通过基因疗法治疗癌症和其它细胞疾病

本发明的核酸可用作治疗癌症和其它需要将免疫系统靶向特殊细胞类型的疾病的基因治疗药物。例如，由人或动物中取出癌细胞，将一种或多种编码多细胞因子融合蛋白的核酸转染入癌细胞中，然后将癌细胞再导入人或动物体内。或者可将DNA引入到癌细胞原位。人或动物随后建立起针对癌细胞的免疫应答，这可治愈或缓解癌症。可通过众多技术中的任一种，将偶合至在哺乳动物细胞中促进表达的合适调节元件的多细胞因子基因融合物转染入癌细胞中，所述方法包括磷酸钙法、“基因枪”法、腺病毒载体转染方法、阳离子脂质体转染方法、反转录病毒载体转染方法或任何其它有效的转染方法。所述核酸可编码进一步融合至其它部分的多细胞因子融合蛋白。

采用表达一种以上融合细胞因子的融合蛋白的核酸进行的抗癌基因治疗可与其它癌症治疗组合进行，如可增强融合细胞因子蛋白的免疫刺激特性的治疗。例如，本发明的核酸还可以表达其它蛋白部分，这些蛋白部分可帮助激发针对癌细胞表达抗原的免疫应答，或者可以与其它表达所述蛋白部分的核酸共转染。具体地说，表达B7共刺激表面蛋白的核酸可共转染入癌细胞中[Robinson等，美国专利第5,738,852号]。用表达多细胞因子融合蛋白的核酸转染癌细胞还可以与采用针对癌细胞的抗体或免疫细胞因子的治疗同时进行[Lode等(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 2475]。用表达多细胞因子融合蛋白的核酸转染癌细胞还可以与采用血管发生阻断剂的治疗同时进行[Lode等(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 9: 1591]。

采用其它免疫刺激物和/或血管发生阻断剂的治疗也可以与采用多细胞因子融合蛋白的系统治疗组合进行。与其它的免疫刺激物或血管发生阻断剂共同治疗的优势在于这些治疗与DNA损伤剂和细胞周期阻断剂不同，它们不杀死可能由于所述多细胞因子融合蛋白的刺激而正在分裂的免疫细胞。

所述基因疗法的一个优选实施方案是将一种或多种编码IL-12和

第二种细胞因子的核酸引入到癌细胞中，然后再将所述癌细胞引入到人或动物中。第二种细胞因子优选为 IL-2 或 GM-CSF。

5 本发明提供新型疫苗组合物和辅助疫苗的方法，该方法使用两种或多种已经融合的细胞因子作为佐剂，用来在接种宿主哺乳动物中产生一种抗某些病原体的保护性细胞介导免疫应答。例如，如果需要 Th1 型免疫应答，则可以融合多种 Th1 促进型细胞因子，并将获得的融合蛋白与抗原一起给予动物。

具体地说，可融合 IL-12 和 IL-2，并与抗原一同给予。或者，可将 IL-12 和 IL-2 进一步融合至抗原性蛋白自身，并用于刺激免疫应答。在此情况下，本发明涉及依赖于宿主的细胞介导免疫的疫苗，10 即激发细胞毒性 T 淋巴细胞和活化吞噬细胞，以提供抗特定病原体感染的保护。特别有用的是用含 IL-12、IL-2 和所述抗原的融合蛋白进行疫苗接种，因为这种组合产生针对所述抗原的 Th1 应答。在人类使用的常规佐剂，如明矾，常常用于诱导 Th2 应答。

15 如果需要 Th2 型免疫应答，则可使用 Th2 促进型细胞因子的融合组合物。例如，可融合 IL-4 和 IL-10 以形成单一分子，获得的融合蛋白用作佐剂。具体地说，如果需要在动物中募集树突细胞，则可将 IL-4 和 GM-CSF 的融合组合物与促进结合抗原提呈细胞的 Fc 区进一步融合，或者与能够将所述融合细胞因子导向靶组织(如肿瘤)20 的抗体进一步融合。

本发明还提供新型治疗组合物和用来提供与某些治疗组合物的协同作用的辅助方法，所述治疗组合物包括所谓的‘癌症疫苗’，可以包括存在于癌细胞上的选定抗原。例如，可通过合适的途径，25 将含两种或多种融合细胞因子的蛋白连同适当处理的癌细胞一起直接给予。



## 实施例

### 实施例1: 构建能够表达细胞因子-细胞因子融合蛋白的基因融合物

为制备有众多细胞因子的多功能蛋白, 合成 IL-12 p40 和 IL-2 基因融合物以及 IL-12 p40 和 GM-CSF 基因融合物。另外, 将成熟小鼠 p35 的编码序列(SEQ ID NO: 1)融合至允许高水平表达和有效分泌的启动子序列和前导序列。小鼠 p40-IL-2 和 p40-GM-CSF 的编码序列分别示于 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3。还构建了人 p40-IL-2 融合蛋白(SEQ ID NO: 4)。使用先前公开的表达质粒(Lo 等, Protein Engineering 11: 495-500 [1998]; Lo 等, 美国专利第 5,726,087 号), 构建小鼠 IgG2a Fc 区与小鼠 p35 的融合物(SEQ ID NO: 5)以及人 p35 与人 IgG1 Fc 区的融合物(SEQ ID NO: 6)。

Gillies 等人描述了成熟小鼠和人 p35 与 KS-1/4 抗体重链 C 端的融合蛋白(J. Immunology [1998] 160: 6195-6203)。以相似的方式构建了成熟小鼠和人 p35 与 14.18 抗体重链 C 端的融合蛋白(PCT 国际公开号 WO99/29732)。

本文讨论的融合 p40 与 IL-2 以及融合 p40 与 GM-CSF 的策略类型一般可应用于两种或多细胞因子的融合蛋白。具体地说, 大多数 N 端部分的编码序列包含用于分泌的信号序列, 而 C 端部分不需要信号序列。在某些情况下, 可将短肽接头编码序列(优选 10-15 个氨基酸长, 富含甘氨酸和丝氨酸)置于两种细胞因子的编码序列之间。涉及制备所有所述类型的融合蛋白的 DNA 操作都在本领域的技术水平范围内。

例如, 以下描述了构建小鼠 IL-12 p40 亚单位与小鼠 IL-2 的融合蛋白的细节。通过 PCR 由伴刀豆球蛋白 A (Concavalin A)活化的小鼠脾细胞(每 ml 培养基 5  $\mu$ g 伴刀豆球蛋白 A, 活化 3 天)克隆小鼠 IL-12 p40 亚单位的全长 cDNA。正向引物序列为 AA GCT AGC ACC ATG TGT CCT CAG AAG CTA ACC (SEQ ID NO: 7), 其中 NheI 位点 GCTAGC (SEQ ID NO: 7 的残基 3-8)位于翻译起始密码子 ATG 的上

游, 而反向引物序列为 *CTC GAG CTA GGA TCG GAC CCT GCA GGG* (SEQ ID NO: 8), 其中 XhoI 位点 *CTCGAG* (SEQ ID NO: 8 的残基 1-6) 紧接着位于翻译终止密码子 TAG(反密码子为 **CTA**) 的下游。验证序列后, 将含有 mu-p40 cDNA 及其天然前导序列的 NheI-XhoI 片段连接至 XbaI-XhoI 消化的表达载体 pdCs [Lo 等(1998) Protein Engineering 11: 495-500]。限制位点 NheI 和 XbaI 具有匹配粘性末端, 而 NheI 位点用于克隆 mu-p40, 因为 mu-p40 具有内部 XbaI 位点。

为了构建 mu-p40-muIL-2 编码 DNA, 使用寡核苷酸接头经由 PstI 位点(*C TGC AG*) 连接 mu-p40 DNA 与含有成熟小鼠 IL-2 cDNA 的 SmaI-XhoI 片段。在所述融合蛋白连接处的 DNA 序列为 *C TGC AGG GTC CGA TCC CCG GGT AAA GCA CCC* (SEQ ID NO: 9), 其中 *C TGC AG* (SEQ ID NO: 9 的残基 1-6) 为 PstI 位点, *C CCG GG* (SEQ ID NO: 9 的残基 15-20) 为 SmaI 位点, **TCC** 是小鼠 p40 的 C 端氨基酸残基, 而 **GCA** 是成熟小鼠 IL-2 的 N 端残基。

通过用 muGMCSF cDNA 在 SmaI 位点置换 muIL2 cDNA, 由编码以上的单链 muIL12-muIL2 的 DNA 构建物获得单链 muIL12-muGMCSF 编码 DNA。在单链 muIL2 和 muGMCSF 连接处的 DNA 序列为 *C TGC AGG GTC CGA TCC CCG GGA AAA GCA* (SEQ ID NO: 10), 其中 *C TGC AG* (SEQ ID NO: 10 的残基 1-6) 为 PstI 位点, *C CCG GG* (SEQ ID NO: 10 的残基 17-22) 为 SmaI 位点, **TCC** 是小鼠 p40 的 C 端氨基酸残基, 而 **GCA** 是成熟小鼠 GMCSF 的 N 端残基。

### 实施例 2: 表达 IL-12 融合蛋白

如下表达 IL-12-IL-2 融合蛋白。将不同组合的编码 p40 融合蛋白的单个载体和编码含 p35 的蛋白的载体共转染入人 293 表皮癌细胞, 以瞬时表达融合蛋白。使用制备型试剂盒(Wiazrd, Promega Inc.) 纯化 DNA, 乙醇沉淀以灭菌, 并在无菌水中重悬浮。

为了表达生物活性 IL-12 融合蛋白异源二聚体,通过共转染人 293 表皮癌细胞瞬时表达不同组合的编码融合形式亚单位和非融合形式亚单位的单个载体。使用制备型试剂盒(Wiazrd, Promega Inc.)纯化 DNA,乙醇沉淀以灭菌,并在无菌水中重悬浮。使用 10  $\mu\text{g}$  DNA/ml (当共转染两个质粒时质粒 DNA 各 5  $\mu\text{g}$ )通过标准方法制备磷酸钙沉淀,按 0.5 ml/板加入到在 60 mm 平板中培养的约 70%融合的 293 培养物中(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 编著, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。16 小时后,去除含所述沉淀的培养基,代之以新鲜培养基。3 天后,取出上清液,通过 ELISA 分析产生的转染基因表达、生物测定 IL-12 活性或者对放射性标记蛋白进行免疫沉淀和 SDS 凝胶分析。为了标记,在培养第 2 天使用无甲硫氨酸的培养基代替所述生长培养基,并加入  $^{35}\text{S}$ -甲硫氨酸(100  $\mu\text{Ci/ml}$ )。再温育 16 小时后,收获所述培养基,通过离心澄清(在台式微型离心机中以 13,000 rpm 离心 5 分钟)并与 A 蛋白琼脂糖珠(每 ml 培养上清液 10  $\mu\text{l}$  珠量)温育。于室温 1 小时后,通过重复的离心和在含 1% Nonidet-P40 (NP-40)的 PBS 缓冲液中重悬浮清洗所述琼脂糖珠。将最终的沉淀在含 SDS 的凝胶缓冲液中重悬浮,并煮沸 2 分钟。离心去除琼脂糖珠后将上清液分为两等份。向 1 个样品中加入还原剂(5% 2-巯基乙醇),将两个样品都煮沸 5 分钟,然后上 SDS 聚丙烯酰胺凝胶。电泳后将所述凝胶对 X 射线胶片曝光(放射自显影)。

使用以下的表达质粒剂进行转染: mu.p35 + mu.p40-IL-2、KS-1/4-mu.p35 + mu.p40、KS-1/4-mu.p35 + mu.p40-IL-2、14.18-mu.p35 + mu.p40-IL-2、hu.Fc-p35 + hu.p40-IL-2、KS-1/4-hu.p35 + hu.p40-IL-2 和 14.18-hu.p35 + hu.p40-IL-2,其中“mu”是指小鼠蛋白,而“hu”是指人蛋白。

当用  $^{35}\text{S}$ -甲硫氨酸代谢标记细胞并用还原性 SDS 凝胶电泳和放射自显影检测分泌性蛋白时,在每种情况下都观察到高水平表达。

根据组成蛋白的分子量预测的还原性融合蛋白的分子量如下：IL-12 p35, 35 kD; IL-12 p40, 40 kD; IL-12, 16 kD; Fc, 32 kD; Ig 重链, 55 kD; 以及 Ig 轻链, 28 kD。观测到的蛋白迁移约为预测的分子量。

还分离了表达多细胞因子融合蛋白的稳定转染细胞系。在异源二聚体构建物情况下, 编码 IL-12 p40-IL-2 或 IL-12 p40-GM-CSF 融合蛋白的表达载体如早前对单独的 IL-12 p40 亚单位所述(Gillies 等 [1998] J. Immunol. 160: 6195-62030)。按照所述(Gillies 等 [1998] J. Immunol. 160: 6195-62030)用编码 IL-12 p35 亚单位、Fc-p35 融合蛋白或抗体-p35 融合蛋白的表达载体第二次转染表达 p40 融合蛋白的转染细胞系。

收集表达人 Fc-IL-12-IL-2(即表达 KS-p35 和 p40-IL-2)的稳定转染细胞系的上清液, 按照生产商的方法(Repligen, Needham, MA)通过与 A 蛋白琼脂糖结合并从其上洗脱, 纯化产物。通过 ELISA 测定纯化蛋白中的 IL-12 和 IL-2 含量。结果显示各种细胞因子含量在质量上相差约 4 倍, 与 IL-12 和 IL-2 的分子量相差 4 倍有关。同样地, 通过 ELISA 测定表达人 KS-IL-12-IL-2 的转染细胞产物的 IL-12 和 IL-2 水平得到相似的 IL-12 和 IL-2 值。因此, 在 ELISA 精度范围内, 检测值表示 IL-12 和 IL-2 以约 1: 1 摩尔比产生。用 Fc 或完整抗体制备的 IL-12-GM-CSF 融合蛋白获得相同的结果。

20

### **实施例 3: 融合蛋白在 IFN- $\gamma$ 诱导测定中的协同活性**

使用人类志愿者的静止或促有丝分裂原活化的人外周血单核细胞(PBMC)以 IFN- $\gamma$  诱导测定检测 IL-12-IL-2 融合蛋白的生物活性(图 6)。通过 ELISA 检测 IFN- $\gamma$  产生。

25

由健康志愿者获得人外周血单核细胞(PBMC), 通过 Ficoll-Hypaque (Pharmacia)梯度离心(1700rpm, 20 分钟)纯化。用无血清培养基(SF-RPMI)将含 PBMC 的“血沉棕黄”层稀释至 50 ml 体积, 于 1000 rpm 离心 5 分钟收集。梯度离心后, 在有或没有植物凝集素

(PHA; 10  $\mu\text{g/ml}$ )的情况下, 在含 10%胎牛血清的细胞培养基(RPMI-10)中以  $5 \times 10^6$  细胞/ml 的密度重悬浮细胞, 并在湿润的  $\text{CO}_2$  培养箱中于  $37^\circ\text{C}$  培养 3 天。离心收集细胞, 用等体积的 SF-RPMI 清洗三次, 并在新鲜 RPMI-10 中重悬浮( $1 \times 10^6$  细胞/ml)。将等份溶液(100  $\mu\text{l}$ )分散入多个 96 孔平板的各孔中, 每孔的最终细胞数为  $10^5$  个。在新鲜培养基中连续稀释培养基测试样品, 并加入到所述 96 孔平板的各孔中。对照孔加入 IL-12(图 6A)或市售 IL-2 和 IL-12 的等摩尔混合物(图 6B; 细胞因子购自 R&D Systems)。在  $\text{CO}_2$  温育箱中于  $37^\circ\text{C}$  温育所述平板 48 小时, 此时取出等份溶液(20  $\mu\text{l}$ )按照生产商的说明(Endogen, Inc., Woburn, MA USA)通过 ELISA 分析 IFN- $\gamma$  浓度。

在图 6A 中, 比较人 IL-12-IL-2 融合蛋白和单独的 IL-12 的活性。结果表明单独的 IL-12 诱导中等水平的 IFN- $\gamma$ , 而 IL-12-IL-2 融合蛋白强烈诱导 IFN- $\gamma$  合成。因为还已知 IL-2 不足以合成 IFN- $\gamma$ , 所以这些结果表明 IL-12 和 IL-2 部分不但在所述融合蛋白中都有功能, 而且还协同起作用。

再者, 比较了 Fc-IL-12-IL-2 融合蛋白、KS-IL-12-IL-2 融合蛋白和由 1:1 摩尔比的 IL-12 和 IL-2 组成的混合物在诱导 IFN- $\gamma$  能力方面的活性。图 6B 的结果表明, Fc-IL-12-IL-2 融合蛋白和 KS-IL-12-IL-2 融合蛋白与 IL-12 和 IL-2 等摩尔混合物具有大约相同的活性。当使用小鼠形式的 IL-2 和 IL-12 构建融合蛋白时, 获得了相同的结果, 其中所述小鼠形式的 IL-2 和 IL-12 通过在实施例 1 描述的用于构建人类形式的 IL-2 和 IL-12 的方式构建。

#### **实施例 4: IL-12-IL-2 融合蛋白的 IL-2 和 IL-12 生物活性**

以增殖型测定比较了融合蛋白中的 IL-2 和 IL-12 活性与单独的细胞因子的活性。以典型的 IL-12 增殖测定测试了小鼠抗体 14.18-IL-12-IL-2 分子的活性。由志愿者获得人 PBMC, 将其与 5  $\mu\text{g/ml}$  植物凝集素-P 培养 3 天, 用 Hank's HBSS 清洗, 按照标准方法以  $10^5$  细

胞/孔平板接种入微量培养板(Gately, M.K., Chizzonite, R.和 Presky, D.H. *Current Protocols in Immunology* [1995] 6.16.1-6.16.15 页)。在各种测试蛋白存在下温育细胞 48 小时,并在测定放射性掺入水平之前 10 小时加入 0.3  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -胸苷。IL-12 和 IL-12 与 IL-2 的等摩尔混合物以剂量依赖方式刺激  $^3\text{H}$ -胸苷掺入细胞, 14.18-IL-12-IL-2 融合蛋白在刺激  $^3\text{H}$ -胸苷掺入方面差不多等效。IL-2 仅在较高摩尔浓度刺激  $^3\text{H}$ -胸苷掺入,表明所观察到的 14.18-IL-12-IL-2 融合蛋白刺激的  $^3\text{H}$ -胸苷掺入主要是由于其 IL-12 活性。结果示于图 7。

另外,按照标准方法(Davis, L.S., Lipsky, P.E.和 Bottomly, K. *Current Protocols in Molecular Immunology* [1995] 6.3.1-6.3.7 页)以不同的细胞增殖测定测试 IL-2 部分的生物活性。小鼠 CTLL-2 细胞系增殖依赖于 IL-2。CTLL-2 细胞系还可以在 IL-4 作用下增殖,但对 IL-12 没反应。将处于活跃对数生长期的 CTLL-2 细胞在缺少 IL-2 的培养基中清洗 2 次,并在各种量的市售小鼠 IL-2、小鼠 14.18-IL-12-IL-2 融合蛋白或市售小鼠 IL-12 存在下以约  $1 \times 10^4$  细胞/孔接种在微量滴定板上,培养 48 小时。在培养结束时,使用 MTT/MTS 测定定量活细胞数。图 8 显示了一个其中 IL-2、IL-12 或 14.18-IL-12-IL-2 融合蛋白水平变化的实验。结果显示小鼠 IL-2 和小鼠 14.18-IL-12-IL-2 融合蛋白在刺激细胞增殖方面差不多等效,而小鼠 IL-12 量增加没有对细胞增殖产生可检测的刺激作用。该结果表明 14.18-IL-12-IL-2 融合蛋白刺激 CTLL-2 细胞增殖是缘于 IL-2 部分而不是 IL-12 部分。

#### **实施例 5: 构建和表达具有和没有抗体部分的单链和多链 IL-12-IL-2 融合蛋白**

如下构建单链小鼠 IL-12-IL-2 融合蛋白。通过与实施例 1 中构建人 p40-IL-2 融合蛋白使用方法类似的方法构建 p40-IL-2 编码序列融合蛋白。为连接编码 IL-12 的 p35 和 p40 亚单位的 DNA 和产生单一编码序列,合成在 5'末端具有 XhoI 位点和在 3'末端具有 BamHI

位点的接头编码 DNA。修饰成熟 p40-IL-2 编码序列的 5'末端，以引入限制性位点，然后连接至所述接头的 3'末端。修饰小鼠 p35 编码序列的 3'末端，以产生限制性位点，并连接至所述接头的 XhoI 位点。利用 p40 中适宜的限制性位点组合编码实施例 1 中所述的单链 muIL12 和 mu-p40-muIL2 的 cDNA，获得编码单链 muIL12-muIL2 的第三个 DNA 构建物。这些步骤使用不同载体进行，并需要根据需要分离 DNA 片段。获得的小鼠 p35-接头-p40-IL-2 编码区序列为 SEQ ID NO: 11。

与此同时，通过相应的方法构建对应的单链小鼠 IL-12 编码序列。该编码序列为 SEQ ID NO: 12。

另外，我们还构建了编码融合至 p35-接头-p40-IL-2 N 端的小鼠 IgG2a Fc 区的 DNA 序列。该编码序列为 SEQ ID NO: 13。

用编码小鼠单链 Fc-IL-12-IL-2 和 Fc-IL-12 蛋白的表达质粒转染培养的 293 细胞。如实施例 2 所述测定融合蛋白的表达。通过与 A 蛋白琼脂糖凝胶结合纯化 Fc 融合蛋白，并观测到 Fc-IL-12-IL-2 和 Fc-IL-12 高水平表达。根据 SDS 凝胶迁移的表观分子量：Fc-IL-12-IL-2，123 kD；和 Fc-IL-12，107 kD 推断，合成了完整蛋白。

实施例 1 中描述的 KS-scIL12-IL2 融合蛋白是一种四聚体，具有两种不同多肽链：KS-1/4 轻链和 KS-1/4 重链及在 C 端的 scIL12-IL2 部分。为研究抗体分子上的哪些位点适于结合细胞因子部分，构建了其中 KS-1/4 抗体、IL-12 和 IL-2 部分的构型与实施例 1 中的 KS-IL12-IL-2 构型不同的第二种融合蛋白。该第二种蛋白为四聚体，由两种不同的多肽组成。一种多肽由 KS-1/4 抗体的轻链组成。另一种多肽包括融合至 KS1/4 抗体重链成熟 N 端的单链 muIL12，后面是在重链羧基端的小鼠 IL-2。

通过 PCR 由伴刀豆球蛋白 A 活化的小鼠脾细胞(每 ml 培养基 5  $\mu$ g 伴刀豆球蛋白 A, 活化 3 天)克隆编码小鼠 IL-12 p35 亚单位的 cDNA。正向引物序列为 AAGCTT GCTAGCAGC ATG TGT CAA TCA CGC TAC (SEQ ID NO: 14)，其中 HindIII 位点 AAGCTT (SEQ ID NO: 14

的残基 1-6)位于翻译起始密码子 ATG 的上游, 而反向引物序列为 *CTCGAG CTT TCA GGC GGA GCT CAG ATA GCC* (SEQ ID NO: 15), 其中 XhoI 位点 *CTCGAG* (SEQ ID NO: 15 的残基 1-6)位于翻译终止密码子 TGA(反密码子为 TCA)的下游。

- 5 编码单链 IL-12 的 DNA 包括连接寡核苷酸的 mup35 DNA, 其后为 mup40 DNA, 其中所述寡核苷酸编码富含甘氨酸和丝氨酸残基的接头。获得的构建物在寡核苷酸连接处具有以下序列:

Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
*G AGC TCC GCG TCG AGC GGG GGC AGC GGG GGC GGA GGC AGC GGC GGG GGC GGA TCC*

Ala (SEQ ID NO:17)  
 GCC ATG (SEQ ID NO:16)

- 10 其中 *G AGC TC* (SEQ ID NO: 16 的残基 1-6)为 SacI 限制位点, 恰好位于小鼠 p35 翻译终止密码子上游, *GCG* 编码小鼠 p35 的 C 端氨基酸残基, *GGA TCC* (SEQ ID NO: 16 的残基 50-55)是为了有利于连接而引入的 BamHI 限制性位点, 而 *ATG* 编码成熟 mu-p40 的 N 端残基。

- 15 编码单链 muIL12-KS 重链-muGMCSF 的 DNA 在 mup40 和 KS 重链的成熟 N 端连接处的序列如下:

Pro Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
*CTGC AGG GTC CGA TCC CCG GGA TCC GGA GGT TCA GGG GGC GGA GGT AGC GGC GGA*

Gly Gly Ser Leu Ser (SEQ ID NO:19)  
 GGG GGC TCC TTA AGC CAG (SEQ ID NO:18)

- 20 其中 *C TGC AG* (SEQ ID NO: 18 的残基 1-6)为 PstI 位点, 恰好位于小鼠 p40 翻译终止密码子上游, *TCC* 编码小鼠 p40 的 C 端氨基酸残基, 而 *CAG* 编码成熟 KS 重链的 N 端残基。然后将获得的编码单链 muIL12-KS 重链-muIL2 的 DNA 与 KS 轻链共表达。

为进一步研究抗体分子的哪个末端可用于产生融合连接以及为



了研究许多截然不同的多肽怎样可以装配入一个多细胞因子融合蛋白中，表达含 KS-1/4、IL-12 和 IL-2 的第三种蛋白，即 IL12-KS(轻链) + KS(重链)-IL2，并测试其活性。该融合蛋白为六聚体，并含有三种不同多肽。一种多肽由小鼠 p35 与 KS1/4 抗体轻链融合组成。

- 5 第二种多肽由融合至人 IL-2 的 KS1/4 抗体重链组成[Gillies 等(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1428]，而第三种多肽为小鼠 p40。在表达时，两条轻链和两条重链以二硫键键合，形成四聚体抗体-细胞因子结构。另外，轻链 N 端的 p35 还与 p40 以二硫键结合。

编码 mup35-KS 轻链的 DNA 在连接处的序列如下：

Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
G AGC TCC GCG TCG AGC GGG GGC AGC GGG GGC GGA GGC AGC GGC GGG GGC GGA TCC

Leu Ser (SEQ ID NO:21)

TTA AGC GAG (SEQ ID NO:20)

- 10 其中 G AGC TC (SEQ ID NO: 20 的残基 1-6)为 SacI 限制性位点，恰好位于小鼠 p35 翻译终止密码子上游，GCG 编码小鼠 p35 的 C 端氨基酸残基，GGA TCC (SEQ ID NO: 20 的残基 50-55)是为有利于连接而引入的 BamHI 限制性位点，而 GAG 编码轻链的 N 端氨基酸残基。

- 15 为表达此六聚体融合蛋白，通过用含新霉素抗性基因的表达载体转染并用 G418 选择，获得表达小鼠 p40 的细胞系。然后用含轻链和重链转录单元以及允许用氨甲蝶呤选择的二氢叶酸还原酶选择标记的表达载体转染表达小鼠 p40 的细胞系[Gillies 等(1998) J. Immunol. 160: 6195]。

#### 20 实施例 6: 小鼠单链 IL-12-IL-2 融合蛋白活性

使用在实施例 4 中使用的相同方法测试通过瞬时表达产生的小鼠单链 IL-12-IL-2 的活性。首先通过 ELISA 测定细胞培养上清液中每种细胞因子的量，并用于建立剂量-反应曲线。所述活性与用上述 Fc 和抗体 IL-12-IL-2 融合蛋白发现的活性密切相关。

- 25 具体而言，以实施例 4 描述的人 PBMC 细胞增殖测定测试小鼠

单链(sc) IL-12-IL-2 和小鼠 Fc-scIL-12-IL-2 分子的 IL-12 活性。IL-12 和 IL-12 与 IL-2 的等摩尔混合物以剂量依赖方式刺激 <sup>3</sup>H-胸苷掺入细胞中。以每摩尔为基准，scIL-12-IL-2 和 Fc-scIL-12-IL-2 融合蛋白在刺激 <sup>3</sup>H-胸苷掺入方面与 IL-12 大致等效(图 9)。如实施例 4 所述，IL-2 仅在非常高摩尔浓度刺激 <sup>3</sup>H-胸苷掺入，表明所观察到的 scIL-12-IL-2 融合蛋白刺激的 <sup>3</sup>H-胸苷掺入主要是由于其 IL-12 活性。

另外，在细胞型测定中测试 scIL-12-IL-2 融合蛋白的 IL-2 部分的生物活性，发现其与市售 IL-2 以每摩尔为基准在所述测定的精度范围内大致相同。如实施例 4 所述，在 CTLL-2 细胞增殖测定中测试 IL-2 部分的生物活性。结果表明，小鼠 IL-2、小鼠 scIL-12-IL-2 和小鼠 Fc-IL-12-IL-2 融合蛋白在刺激增殖的能力上大致相等，小鼠 IL-12 对 CTLL-2 细胞增殖不产生可检测的刺激作用。这些结果表明 scIL-12-IL-2 融合蛋白对 CTLL-2 细胞增殖的刺激作用缘于 IL-2 部分而不是 IL-12 部分。

还在细胞型测定中测试了实施例 5 描述的 Fc-IL12-IL2、IL12-KS-IL2 和 IL12-KS(轻链)+KS(重链)-IL2 蛋白的 IL-12 活性和 IL-2 活性。使用 PBMC 细胞增殖/氘化胸苷掺入测定，Fc-IL12-IL2、IL12-KS-IL2 和 IL12-KS(轻链)+KS(重链)-IL2 蛋白都显示出有效的 IL-12 活性。同样地，使用 CTLL-2 细胞增殖测定，Fc-IL12-IL2、IL12-KS-IL2 和 IL12-KS(轻链)+KS(重链)-IL2 蛋白都显示出有效的 IL-2 活性。另外，在 ELISA 中 IL12-KS-IL2 和 IL12-KS(轻链) + KS(重链)-IL2 蛋白都紧密结合 EpCAM 抗原，即使重链和轻链 V 区分别融合至其它蛋白的 N 端。

#### 25 实施例 7: 小鼠 IL-12-GM-CSF 融合蛋白的活性

在细胞增殖测定中测试小鼠 Fc-IL-12-GM-CSF 的 IL-12 活性(图 10)。由三个志愿者获得人 PBMC，将其与 5 μg/ml 植物凝集素-P 培养 3 天，用 Hank's HBSS 清洗，按照标准方法以 10<sup>5</sup> 细胞/孔接种入

微量滴定板(Gately, M.K., Chizzonite, R. 和 Presky, D.H. *Current Protocols in Immunology* [1995] 6.16.1-6.16.15 页)。在各种测试蛋白存在下温育细胞 48 小时,并在测定放射性掺入水平之前 10 小时加入 0.3  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -胸苷。IL-12 和 IL-12 与 GM-CSF 的等摩尔混合物以剂量依赖方式刺激  $^3\text{H}$ -胸苷掺入细胞,而 14.18-IL-12-GM-CSF 融合蛋白在刺激  $^3\text{H}$ -胸苷掺入方面差不多等效。GM-CSF 在测试浓度不刺激  $^3\text{H}$ -胸苷掺入,表明所观察到的 14.18-IL-12-GM-CSF 融合蛋白刺激的  $^3\text{H}$ -胸苷掺入主要是由于其 IL-12 活性。

另外,在细胞型测定中测试了各种 IL-12-Gm-CSF 融合蛋白的 GM-CSF 部分的生物活性。发现 GM-CSF 部分有活性,每摩尔的活性与市售 GM-CSF 在相同的常规范围内。例如,在不同的细胞增殖测定中按照分子免疫学领域熟练技术人员已知的方法(Cooper, S.C.和 Broxmeyer, H.E., *Current Protocols in Molecular Immunology* [1996] 6.4.1-6.4.20 页)测试 GM-CSF 部分的生物活性。小鼠 32D(GM)细胞系增殖依赖于 GM-CSF; 该细胞系由 Cooper 和 Broxmeyer 描述的原始 32D 细胞系改变获得,对 GM-CSF 特别敏感(Faas 等, *Eur. J. Immunol.* [1993] 23: 1201-14)。32D(GM)细胞系对 IL-12 无应答。将处于活跃对数生长期的 32D(GM)细胞在没有 GM-CSF 的培养基中清洗两次,并在各种量的市售小鼠 GM-CSF 或小鼠 IL-12-GM-CSF 融合蛋白存在下以约  $5 \times 10^3$  细胞/孔接种在微量滴定板各孔中,培养 48 小时。在测定放射性掺入水平之前 16 小时加入 0.3  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -胸苷。随着 IL-12-GM-CSF 融合蛋白水平增加,  $^3\text{H}$ -胸苷掺入呈剂量反应性增加,表明 IL-12-GM-CSF 融合蛋白的 GM-CSF 部分有活性。而且,以 1 摩尔为基准计算,所述融合蛋白的 GM-CSF 生物活性与市售小鼠 GM-CSF 相当。

**实施例 8：用多细胞因子融合蛋白治疗免疫功能良好(*immune-proficient*)的哺乳动物的结肠癌**

为测试多细胞因子-抗体融合蛋白是否可用于治疗免疫系统完好的哺乳动物的结肠癌，进行了以下实验。CT26 是得自 Balb/C 小鼠的结肠癌细胞系。通过标准的遗传工程技术工程该细胞系，使其表达人上皮细胞粘附分子(EpCAM)，EpCAM 是 KS-1/4 抗体识别的抗原；  
5 这些细胞被称为 CT26/KSA 细胞。

用  $2 \times 10^6$  CT26/KSA 细胞皮下接种 Balb/C 小鼠。当肿瘤体积达到约 100-200  $\text{mm}^3$  时，随机将小鼠分为三组，每组 9 只，供进一步研究用。从第 0 天开始用 PBS、约 3.4  $\mu\text{g}$  KS-IL2 与约 5.3  $\mu\text{g}$  KS-IL12 的混合物或约 6  $\mu\text{g}$  KS-IL2-IL12 治疗肿瘤小鼠。这些剂量用来将相等数量 IL-12 和 IL-2 分子传递给每组小鼠。对小鼠进行肿瘤内注射，  
10 每天一次，共 5 天。用测径器检测肿瘤大小。

一个这样的实验的结果示于图 11。在该实验中，KS-IL12-IL2 极为显著地抑制肿瘤生长。KS-IL12 和 KS-IL2 的混合物也明显抑制肿瘤生长，但不如 KS-IL12-IL2 彻底。在 KS-IL12-IL2 治疗的小鼠组中，9 只小鼠中的 6 只肿瘤表观治愈：这 6 只小鼠直至所述实验终止时的第 93 天仍存活；而且这些小鼠中的肿瘤萎缩和消失，从第 39 天至第 93 天不能检测到皮下肿瘤。另 3 只小鼠的肿瘤生长延迟，肿瘤体积仅在第 87 天后超过 4,000  $\text{mm}^3$ 。  
15

在 KS-IL12 和 KS-IL2 混合物治疗的小鼠中，2 只小鼠的皮下肿瘤表观治愈，直至实验结束时仍存活。余下的 7 只小鼠的肿瘤没有消失，最终生长至体积为 1,000  $\text{mm}^3$  (1 只小鼠)或大于 4,000  $\text{mm}^3$  (6 只小鼠)。  
20

KS-IL12-IL2 比 KS-IL12 和 KS-IL2 的等摩尔混合物更有效的事实令人惊奇。该实验中的给予剂量为每剂约 19 pmol 融合蛋白，相当于约  $9 \times 10^{12}$  个分子。在治疗开始时，每个肿瘤的体积约 160  $\text{mm}^3$ ，相当于约 1.6 亿个细胞。每个细胞表达约  $10^6$  个 EpCAM 分子，由此  
25

KS 抗体可能结合的 EpCAM 抗原分子约  $1.6 \times 10^{14}$  个。因此，当混合 KS-IL12 和 KS-IL2 并注射入带有所述肿瘤的小鼠中时，这两种免疫细胞因子融合蛋白互相之间不大可能竞争抗原结合部位。因此，对于 KS-IL12 和 KS-IL2 混合物和 KS-IL12-IL2 而言，在肿瘤部位的 IL12 和 IL2 有效剂量应当至少一样高。

#### **实施例 9. 用多细胞因子融合蛋白治疗免疫缺陷哺乳动物中的结肠癌**

许多形式的癌症治疗具有杀伤分裂细胞的作用，包括免疫系统细胞。因此，癌症患者常常发生免疫抑制。为了了解多细胞因子融合蛋白是否可用于治疗免疫系统受抑制的哺乳动物，用 KS-IL12-IL2、KS-IL12 和 KS-IL2 的混合物或 PBS 治疗带有 CT26/KSA 肿瘤的 SCID 小鼠。SCID 小鼠的 B 细胞和 T 细胞均存在缺陷，依赖于具抗感染能力的先天免疫系统分支如 NK 细胞。

如实施例 8 所述制备携带皮下 CT26/KSA 肿瘤的小鼠。用与实施例 8 相同的给药剂量和方案通过肿瘤内注射治疗三组各 8 只携带约 100-200 mm<sup>3</sup> 肿瘤的小鼠。结果示于图 12。在该实验中，KS-IL12-IL2 融合蛋白与 KS-IL12 和 KS-IL2 的混合物差不多等效：第 25 天时每组 8 只小鼠中的 5 只被治愈。然而，在未治愈的小鼠中，6 个肿瘤中的 5 个开始以未治疗小鼠的肿瘤特征性速率生长，有效延迟约 14-21 天。这与实施例 8 中的免疫良好小鼠的肿瘤大不相同：即使在用 KS-IL12-IL2 治疗未完全消除肿瘤时，实验开始后约 60 天后肿瘤才开始侵蚀性生长。

这些实验证明，多细胞因子抗体融合蛋白可用于治疗免疫抑制动物癌症。

#### **实施例 10. 通过肿瘤内注射多细胞因子融合蛋白治疗肺癌：与单独免疫细胞因子治疗比较**

为了解多细胞因子融合蛋白和具有单一细胞因子部分的免疫细

胞因子抗肺细胞衍生癌症的有效性,进行了以下实验。

Lewis 肺癌(LLC)是在 C57BL/6 小鼠中产生的一种侵袭性肿瘤。通过标准遗传工程技术构建表达人 EpCAM 蛋白的 LLC 细胞系;此细胞系称为 LLC/KSA。

- 5           如实施例 8 所述制备携带皮下 LLC/KSA 肿瘤的 C57BL/6 小鼠(用 KML 核对细胞序号#)。通过肿瘤内注射治疗四组各 5 只携带约 100-200 mm<sup>3</sup> 肿瘤的小鼠 5 天。用 PBS、约 20 μg KS-IL12、约 20 μg KS-IL12 或约 20 μg KS-IL12-IL2 注射小鼠。

- 10           结果示于图 13。在此实验中,KS-IL12-IL2 融合蛋白远比 KS-IL12 或 KS-IL2 有效。在用 KS-IL12-IL2 融合蛋白治疗的所有小鼠中,肿瘤至第 27 天全部消失。在第 74 天,对这些小鼠进行实施例 14 所述的肺转移测定;在干预期或第二个实验期间,原来的皮下肿瘤没有再出现。相反,KS-IL2 或 KS-IL12 治疗使肿瘤外观有一定缩小以及肿瘤生长明显延迟,但肿瘤最终还是生长。比较此实验和前述实验的结果表明,对于某些疾病和给予方式,用具有不同细胞因子部分的免疫细胞因子混合物治疗优于用单一类型的免疫细胞因子治疗。
- 15

#### **实施例 12. 通过肿瘤内注射多细胞因子融合蛋白治疗肺癌: 与免疫细胞因子混合物治疗比较**

- 20           为了解多细胞因子融合蛋白和具有不同细胞因子部分的免疫细胞因子混合物对肺细胞性癌症的有效性,进行以下实验。

- 如实施例 11 所述制备携带皮下 LLC/KSA 肿瘤的 C57BL/6 小鼠。通过肿瘤内注射治疗三组各 7 只携带约 100-200 mm<sup>3</sup> 肿瘤的小鼠 5 天。用 PBS、约 18 μg KS-IL12 和约 11.5 μg KS-IL12 的混合物或约 20 μg KS-IL12-IL2 注射小鼠。
- 25

          结果示于图 14。在此实验中,KS-IL12-IL2 融合蛋白远比 KS-IL12 和 KS-IL2 的混合物有效。在用 KS-IL12-IL2 融合蛋白治疗的所有小鼠中,肿瘤至第 27 天为止全部消失。相反,用 KS-IL12 和 KS-IL2

的混合物治疗使肿瘤表现有一定缩小以及肿瘤生长明显延迟，但此治疗组的所有肿瘤最终再发生生长。

### **实施例 13. 多细胞因子抗体融合蛋白的抗原依赖性抗肿瘤活性**

5 为了解多细胞因子-抗体融合蛋白治疗肿瘤的有效性是否依赖于肿瘤特异性表达的所述抗体识别抗原，进行以下实验。

如实施例 11 所述制备携带皮下 LLC/KSA 肿瘤的一组 7 只 C57BL/6 小鼠和携带亲代 LLC 细胞系衍生肿瘤的第二组 9 只小鼠。通过肿瘤内注射治疗这两组携带约 100-200 mm<sup>3</sup> 肿瘤的小鼠 5 天。用  
10 约 20 μg KS-IL12-IL2 注射小鼠。

结果示于图 15。在此实验中，携带 LLC/KSA 肿瘤的所有小鼠的肿瘤都完全治愈。相反，LLC 肿瘤小鼠只有 2 只治愈，其余的 LLC 肿瘤小鼠的肿瘤体积都曾有短时缩小，但肿瘤体积最终增大。

15 这些结果表明，对 EpCAM 表面抗原的识别促进了 KS-IL12-IL2 粘附于 LLC/KSA 肿瘤细胞表面，增强了产生的免疫应答。也观察到对 LLC-衍生肿瘤的一定抗肿瘤作用；尽管不希望受理论束缚，但是仍然认为在此实验中的 KS-IL12-IL2 抗肿瘤作用是由于以下事实：所述融合蛋白直接注射入肿瘤并因此瞬时局限于肿瘤。

### **20 实施例 14. 产生抗肿瘤细胞类型的免疫记忆**

发生转移是癌症治疗中的主要问题。为测试多细胞因子抗体融合蛋白治疗是否可形成抗肿瘤细胞类型的长久免疫记忆，以及是否可预防形成转移，进行了以下实验。

25 实施例 11 中的 5 只 C57BL/6 小鼠用 KS-IL12-IL2 进行了治疗，并且其皮下肿瘤已表现治愈。如实施例 14 所述，从治疗开始计的第 74 天，这 5 只小鼠静脉内注射 10<sup>6</sup> LLC/KSA 细胞。作为对照，还对 8 只 C57BL/6 小鼠静脉内注射 10<sup>6</sup> LLC/KSA 细胞。

在第 28 天，处死小鼠，检查肺部转移。8 只对照小鼠的肺部转

5 移占 70%-100%，肺表面覆盖平均为 85%。这些小鼠的平均肺重量为 0.86 克。相比之下，在 5 只预治疗小鼠的肺表面未发现转移，平均肺重量为 0.28 克，与正常小鼠的肺重量相当。这些结果表明，对原肿瘤细胞的治疗产生了对所述肿瘤细胞的长久免疫记忆；该记忆防止所述肿瘤细胞类型形成转移。

表 X. “肿瘤消退”小鼠对 LLC-KSA 肺转移的保护作用

在先治疗	转移记分	肺重量(g)
无	4, 4, 4, 4, 4, 3, 3	0.88 +/- 0.27
KS-IL12/IL2	0, 0, 0, 0, 0	0.27 +/- 0.03

10 无肿瘤对照组的平均肺重量为 0.2 克。转移记分是基于融合肿瘤转移结节的表面范围百分率，其中 0=无转移；1=1-25%范围；2=25-50%范围；3=50-75%范围；而 4=75-100%范围。

15 测试免疫记忆形成的第二个实验使用实施例 12 的 7 只小鼠中的 6 只，这 6 只小鼠已经注射了 LLC/KSA 肿瘤细胞，产生了皮下肿瘤并且已经使这些肿瘤消失。在实施例 12 的治疗开始后 62 天，对 6 只预治疗小鼠和 10 只原初未治疗的 C57BL/6 对照小鼠皮下注射  $10^6$  LLC 细胞。这些细胞不表达人 KS 抗原 EpCAM。

20 在所述原初小鼠中，注射的 LLC 细胞形成的肿瘤在所有小鼠中快速生长。相比之下，预治疗小鼠肿瘤的生长要慢得多，而在 1 只小鼠中未检测到皮下肿瘤。结果示于图 16。因为人 KS 抗原 EpCAM 不在 LLC 细胞上表达，所以针对 LLC 细胞的免疫应答是基于这些细胞表达的其它抗原。

### 实施例 15. 作为疫苗的多细胞因子融合蛋白

25 多细胞因子融合蛋白当融合至抗原蛋白时可用作疫苗。疫苗部分由 N 端至 C 段的具体顺序或者所述融合蛋白是单一多肽链还是寡聚物，可根据构建表达质粒的方便性而有所变化。可通过各种途径如静脉内、皮下、腹膜内等给予所述蛋白。同样地，给予的剂量和



频率一般需要经验性确定，这是人类疫苗的标准操作，是疫苗开发领域的技术人员众所周知的。

5 例如，给予小鼠抗原-IL-12-细胞因子形式的融合蛋白，其中所述融合蛋白中的细胞因子为与 IL-12 不同的第二种细胞因子。对照小鼠给予相同量的抗原-细胞因子、抗原-IL-12 或单独的抗原。在给予所述抗原融合蛋白期间和/或以后的各个时间通过眼眶后取血收集血样，然后制备血浆并分析抗所述抗原的抗体存在情况。发现产生了抗所述抗原的抗体。而且，针对所述抗原的免疫应答性质为 Th1 型应答特征性的。与某些对照免疫相比，所述抗体应答更强，产生的抗体类型不同。

10 更具体地说，将人源化抗体-小鼠 IL-12-IL-2 融合蛋白的 PBS 缓冲液静脉注射入 Balb/c 小鼠中(5  $\mu$ g/天 $\times$ 5)。对照小鼠接受相同量的相同抗体，但所述抗体未附着 IL-12-IL-2。两种注射溶液都不含有任何其它类型的佐剂。在第 10 天，通过眼眶后取血将血样收集到微量离心管中，并通过收集含柠檬酸钠的塑料管中的血样，接着在 Eppendorf 台式微量离心机中全速离心制备血浆。用人源化抗体蛋白包被 ELISA 板(96 孔)，所述人源化抗体蛋白含有人恒定区，并用于捕获免疫应答中产生的任何小鼠抗体。洗去未结合物质之后，用偶合辣根过氧化物酶的山羊抗小鼠 Fc 抗体(Jackson ImmunoResearch)检测结合的小鼠抗体。任何结合抗体都可能涉及人恒定区或可变区，而人源化抗体和所述融合蛋白共有这二者。

20 对没有融合 IL-12-IL-2 的人源化抗体几乎没有反应性。另一方面，所述融合蛋白在没有外源佐剂的情况下诱导强抗体应答，尽管静脉内给予途径和皮下或腹膜内给予相比对于诱导这种应答是非常不宜的。为典型的 IL-12 增强型应答的 IgG2a 同种型抗体见于抗体-IL-12-IL-2 注射组，但不见于人源化抗体注射组。

25 通过注射融合蛋白(诸如上述融合蛋白)的 PBS 溶液或其它生物相容性缓冲溶液或已知的佐剂(如弗氏不完全佐剂或完全佐剂)，测试

由各种途径给予的抗原-IL-12 多细胞因子融合蛋白的免疫原性。例如，可每两周给予单次或多次的皮下、皮内或腹膜内注射。或者，所述融合蛋白首先可通过皮下注射给予，然后通过腹膜内注射给予。弗氏佐剂由于刺激注射部位而不能用于人类用途。其它佐剂如氢氧化铝沉淀(Alum)被批准用于人类用途并可用于本发明。基于鲨烯和脂质的新型有机化学佐剂也可由于皮肤注射。

#### **实施例 16. 用多细胞因子融合蛋白进行基因治疗**

通过基因疗法传递多细胞因子融合蛋白的抗癌活性也已经被证明可用于治疗肺癌。使用前述病毒载体系统稳定转染 Lewis 肺癌细胞 (pLNCX-scIL-12-IL-2 DNA 或 pLNCX-scIL-12 DNA 转染入 PA317 包装细胞系)。这些构建物编码其中 p35 和 p40 已通过接头连接起来的单链型 IL-12。使用含 G418 的培养基体外选择克隆，并通过 ELISA (R&D Systems) 鉴定稳定表达约 50-60 ng/ml IL-12 的克隆。

将大约  $1 \times 10^6$  和大约  $5 \times 10^6$  的表达 scIL-12 或 scIL-12-IL-2 的 LLC 细胞皮下注射入 C57BL/6 小鼠以及 SCID 小鼠。作为对照，将  $2 \times 10^6$  LLC 细胞注射入 C57BL/6 小鼠以及 SCID 小鼠。表达 IL-12 的 LLC 细胞形成的肿瘤的生长速率与没有被工程为表达细胞因子的 LLC 细胞产生的肿瘤大致相同。然而，在 C57BL/6 小鼠以及在 SCID 小鼠中，表达 scIL-12-IL-2 的 LLC 细胞或者不形成皮下肿瘤，或者形成随后缩小消失的肿瘤(图 17 和 18)。

#### **实施例 17. 构建含 IL-4 和 GM-CSF 的多细胞因子融合蛋白**

细胞因子 IL-4 和 GM-CSF 当联合使用时是有效的树突细胞激活物。如下构建含 IL-4 和 GM-CSF 活性的多细胞因子-抗体融合蛋白。将 GM-CSF 的编码序列按照读框融合至位于前导序列之后的 KS-1/4 抗体重链编码序列的 3' 末端。另外，用接头将 IL-4 的编码序列(包括前导序列)按照读框融合至成熟 KS-1/4 抗体轻链编码序列的 5' 末端。

具体而言，为构建小鼠 IL-4 和 KS-1/4 抗体轻链的融合蛋白编码 DNA，使用正向引物序列 *TCTAGACC ATG GGT CTC AAC CCC CAG C* (SEQ ID NO: 22)通过 PCR 修饰小鼠 IL-4 cDNA，其中 XbaI 位点 *TCTAGA* (SEQ ID NO: 22 的残基 1-6)位于翻译起始密码子 ATG 的上游，而反向引物序列为 *C GGA TCC CGA GTA ATC CAT TTG CAT GAT GCT CTT TAG GCT TTC CAG G* (SEQ ID NO: 23)，它含有的 BamHI 位点 *GGA TCC* (SEQ ID NO: 23 的残基 2-7)紧接着编码小鼠 IL-4 的 C 端氨基酸残基的 TCG 密码子(反密码子为 CGA)的 3'。克隆 PCR 片段并验证序列后，将含有小鼠 IL-4 cDNA 的 XbaI-BamHI 片段连接至编码富含甘氨酸和丝氨酸残基的柔性肽接头的 BamHI-AflII 寡核苷酸双链体。AflII 末端又连接至人工放置于成熟 KS-1/4 轻链 N 端之前的 AflII 位点。在两次连接产生的连接处的 DNA 和蛋白序列如下。

DNA:            **TCG GGA TCC GGA GGT TCA GGG GGC GGA GGT AGC GGC GGA**  
 蛋白:            **(Ser) Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly**

**GGG GGC TCC TTA AGC GAG**            (SEQ ID NO:24)  
**Gly Gly Ser Leu Ser (Glu)**            (SEQ ID NO:25)

在该 DNA 序列中，*GGATCC* (SEQ ID NO: 24 的残基 4-9)和 *CTTAAG* (SEQ ID NO: 24 的残基 48-53)分别为用于再构建的两个限制性位点 BamHI 和 AflII；TCG 编码小鼠 IL-4 的 C 端丝氨酸残基；GAG 编码 KS-1/4 轻链的成熟 N 端；而在 DNA 序列之下显示了富含 GlySer 的肽接头的氨基酸序列。使用前面实施例描述的技术和其它分子生物学标准技术，将包括强启动子的用于高水平表达的辅助序列适当地置于两种融合多肽编码 DNA 节段的周围。

将编码 IL4-KS(轻链)和 KS(重链)-GM-CSF 的融合蛋白的 DNA 序列转染入 NS/O 细胞，高水平表达相应的多肽。SDS-PAGE 在还原条件下显示约 80 kD 的分散带(对应于重链-GM-CSF 多肽)和约 50 kD 的多条带(对应于 IL-轻链融合蛋白)。出现分散带和多条带分别是由

于 IL-4 和 GM-CSF 的可变糖基化。

将所述亚单位装配入其结构对应于图 3G 通式结构的二硫键结合的四聚体蛋白。该蛋白具有 KS-1/4 抗原结合活性、通过其 Fc 区结合 Staph A 蛋白的能力以及 IL-4 和 GM-CSF 的细胞因子活性。通过 IL-4 依赖性刺激 CTLL-2 细胞的氙化胸苷掺入检测 IL-4 活性。通过 GM-CSF 依赖性刺激 32(D) GM 细胞的氙化胸苷掺入检测 GM-CSF 活性。以 1 摩尔为基准, KS-IL4-GMCSF 的 IL-4 活性和 GM-CSF 活性与纯化的 IL-4 和 GM-CSF 相似。

如下构建设没有结合抗体序列的细胞因子 IL-4 和 GM-CSF 的融合蛋白。通过 PCR 由小鼠脾细胞 RNA 克隆小鼠 IL-4。正向引物序列为 *TCTAGACC ATG GGT CTC AAC CCC CAG C* (SEQ ID NO: 26), 其中 XbaI 位点 *TCTAGA* (SEQ ID NO: 26 的残基 1-6) 位于翻译起始密码子 *ATG* 的上游, 而反向引物序列为 *CGA TAT CCC GGA CGA GTA ATC CAT TTG CAT GAT GCT CTT TAG GCT TTC CAG G* (SEQ ID NO: 27), 其中 EcoRV 位点 *GAT ATC* (SEQ ID NO: 27 的残基 2-7) 紧接着编码小鼠 IL-4 C 端氨基酸残基的 TCG 密码子(反密码子为 *CGA*)的 3'。验证序列后, 将含有 muIL-4 cDNA 与其天然前导序列的 XbaI-EcoRV 片段连接至含 muGM-CSF cDNA 的 SmaI-XhoI 片段, 在 muIL-4 和 muGM-CSF 融合的连接处产生以下序列: *ATG GAT TAC TCG TCC GGG ATG GGA AAA GCA CCC GCC CGC* (SEQ ID NO: 28), 其中 muIL-4 的 C 端序列和 muGM-CSF 的 N 端序列为粗体, 而 *G ATG GG* (SEQ ID NO: 28 的残基 17-22) 是将 EcoRV 平端连接至 SmaI 平端产生的序列。然后将获得的编码 muIL4-muGMCSF 的 DNA 克隆入表达载体。通过 SDS-PAGE 分析所表达的蛋白, 发现跑出一条表观分子量为 45-50 kD 的分散带。以 1 摩尔为基准, IL4-GMCSF 的 IL-4 活性和 GM-CSF 活性与纯化的 IL-4 和 GM-CSF 相似。

### 实施例 18. 构建淋巴趋化因子-KS-IL2 编码 DNA 和表达淋巴趋化因子-KS-IL2 蛋白

趋化因子是一类独特的被认为形成梯度和介导免疫细胞趋化性的细胞因子。另外，同其它细胞因子一样，趋化因子也能够诱导特定基因在靶细胞中表达。趋化因子的一个特征在于自由 N 端往往是其活性必需的，这可能对构建融合蛋白的途径构成限制。

构建一种细胞因子-抗体-细胞因子融合蛋白，包含细胞因子淋巴趋化因子(为一种趋化因子)、抗体 KS-1/4 和细胞因子 IL-2。该融合蛋白为四聚体，并含有两种不同多肽。一种多肽包括融合至 KS-1/4 抗体重链 N 端的小鼠淋巴趋化因子，其后为位于 C 端的 IL-2。先前已经描述了 KS-1/4 重链与在 C 端的 IL-2 的融合蛋白—“KS-IL2 重链” [Gillies 等(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1428]。另一种多肽由 KS1/4 抗体轻链组成。

Kelner 和 Zlotnik 公开了小鼠淋巴趋化因子的完全编码序列 (Science 266: 1395 [1998])。为构建小鼠淋巴趋化因子与 KS-IL2 重链的融合蛋白的编码 DNA，使用正向引物 TCTAGAGCCACC ATG AGA CTT CTC CTC CTG AC (SEQ ID NO: 29)通过 PCR 修饰小鼠淋巴趋化因子 cDNA，其中 XbaI 位点 TCTAGA (SEQ ID NO: 29 的残基 1-6)位于翻译起始密码子 ATG 的上游，而反向引物序列为 GGA TCC CCC AGT CAG GGT TAC TGC TG (SEQ ID NO: 30)，其 BamHI 位点 GGA TCC (SEQ ID NO: 30 的残基 1-6)紧接着编码小鼠淋巴趋化因子的 C 端氨基酸残基的 GGG 密码子(反密码子为 CCC)的 3'。克隆 PCR 片段并验证序列后，将含有小鼠淋巴趋化因子 cDNA 的 XbaI-BamHI 片段连接至编码富含甘氨酸和丝氨酸残基的柔性肽接头的 BamHI-AflIII 寡核苷酸双链体。AflIII 末端又连接至人工放置于 KS-IL2 重链成熟 N 端之前的 AflIII 位点。在两次连接产生的连接处的 DNA 序列如下：

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu  
 CCC GGA TCC GGA GGT TCA GGG GGC GGA GGT AGC GGC GGA GGG GGC TCC TTA

Ser (SEQ ID NO:32)

AGC CAG (SEQ ID NO:31)

其中 *GGATCC* (SEQ ID NO: 31 的残基 4-9)和 *CTTAAG* (SEQ ID NO: 31 的残基 48-53)分别为用于再构建的两个限制性位点 BamHI 和 AflIII; *CCC* 编码小鼠淋巴趋化因子的 C 端氨基酸残基; *CAG* 编码 KS-IL2 重链的成熟 N 端; 而在 DNA 序列之上显示了富含 GlySer 的肽接头的氨基酸序列。然后将小鼠淋巴趋化因子-KS-IL2 重链的编码 DNA 克隆入表达载体, 再与 KS1/4 轻链共表达。

使用 T 细胞以 Boyden 室迁移测定(Boyden chamber migration assay)测试表达的淋巴趋化因子-KS-IL2 融合蛋白的淋巴趋化因子活性(Leonard 等, [1999] Current Protocols in Immunology 6.12.3 页)。或者, 使用 NK 细胞。或者, 用在 G 蛋白偶联受体活化作用下的标准细胞钙流量测定观测淋巴趋化因子活性(Maghazachi 等, FASEB J. [1997]; 11: 765-74)。另外, 测试了淋巴趋化因子-KS-IL2 融合蛋白, 发现其在结合 EpCAM 的能力测定中有活性, 并且在 IL-2 活性测定(如 CTLL-2 细胞增殖测定)中也有活性。

15

### 文献引用

本文以上提及的所有出版物都通过引用整体结合到本申请中。

### 等同实施方案

20 可在不背离本发明精神或基本特征的情况下以其它具体形式实施本发明。因此认为前述的实施方案是在所有方面进行阐述, 而不是限制本文描述的本发明。因此, 本发明的范围由所附权利要求书而不是由以上描述限定, 所以权利要求书包括权利要求书等同含义和范围内的所有变化。

---

 序列表

<110> Gillies, Stephen  
Lo, Kin Ming

<120> 多细胞因子蛋白复合物

<130> LEX-010PC

<140>

<141>

<150> 60/147,924

<151> 1999-08-09

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 582

<212> DNA

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<220>

<223> 人工序列的描述: 成熟蛋白的小鼠 p35 编码序列

<400> 1

```

agggtcattc cagtctctgg acctgccagg tgtcttagcc agtcccgaaa cctgctgaag 60
accacagatg acatggtgaa gacggccaga gaaaaactga aacattattc ctgcactgct 120
gaagacatcg atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca gcacattgaa gacctgttta 180
ccactggaac tacacaagaa cgagagtggc ctggctacta gagagacttc ttccacaaca 240
agagggagct gcctgcccc acagaagacg tctttgatga tgaccctgtg ccttggtagc 300
atctatgagg acttgaagat gtaccagaca gagttccagg ccatcaacgc agcacttcag 360
aatcacaacc atcagcagat cattctagac aagggcattg tgggtggccat cgatgagctg 420
atgcagtcct tgaatcataa tggcgagact ctgcgccaga aacctcctgt gggagaagca 480
gaccttaca gagtgaaaaat gaagctctgc atccigtctc acgccttcag caccgcgctc 540
gtgaccatca acagggatgat gggctatctg agctccgcct ga 582

```

<210> 2

<211> 1472

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 小鼠 p40-IL-2 融合蛋白编码序列

<400> 2

```

atgtgtcctc agaagctaac atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg tttgccatcg 60
ttttgctggt gtctccactc atggccatgt gggagctgga gaaagacgtt tatgtttag 120
aggtggactg gactcccgat gcccttgag aaacagtga cctcacctgt gacacgcctg 180
aagaagatga catcacctgg acctcagacc agagacatgg agtcataggc tctggaaaga 240
ccctgacat cactgtcaaa gagtttctag atgctggcca gtacacctgc cacaaggag 300
gcgagactct gagccactca catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggcca 360
ctgaaatfff aaaaaatttc aaaaacaaga ctttcctgaa gtgtgaagca ccaaattact 420
ccggacggtt cacgtgctca tggctggtgc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca 480
agagcagtag cagttcccct gactctcggg cagtgcacatg tggaatggcg tctctgtctg 540
cagagaaggt cacactggac caaagggact atgagaagta ttcagtgtcc tgccaggagg 600
atgtcacctg cccaactgcc gaggagacc tgccattga actggcgttg gaagcacggc 660
agcagaataa atatgagaac tacagacca gcttcttcat caggacatc atcaaaccag 720
acccgcccaa gaacttgca atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg 780
agtaccctga ctctggagc actcccatt cctacttctc cctcaagtc ttgttcgaa 840
tccagcgcaa gaaagaaaag atgaaggaga cagaggaggg gtgtaaccag aaaggtgctg 900
tcctcgtaga gaagacatct accgaagtcc aatgcaaagg cggaatgtc tgcgtgcaag 960
ctcaggatcg ctattacaat tcctcatgca gcaagtgggc atgtgttccc tgcagggtcc 1020
gatccccggg taaagcacc acttcaagct ctacagcggg agcacagcag cagcagcagc 1080
agcagcagca gcagcagcag cacctggagc agctgttgat ggacctacag gagctcctga 1140
gcaggatgga gaattacagg aacctgaaac tcccaggat gctcaccttc aaattttact 1200
tgccaagca ggccacagaa ttgaaagatc ttcagtgcct agaagatgaa ctggacctc 1260
tgcgcatgt tctggatttg actcaaagca aaagcttca attggaagat gctgagaatt 1320
tcatcagcaa tatcagagta actgttgtaa aactaaaggg ctctgacaac acatttgagt 1380
gccaatcga tgatgagtca gcaactgtgg tggactttct gaggagatgg atagccttct 1440
gtcaaagcat catctcaaca agccctcaat aa 1472

```

<210> 3

<211> 1409

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 小鼠 p40-GM-CSF 融合蛋白编码序列

<400> 3

```

atgtgtcctc agaagctaac atgtgtcctc agaagctaac catctcctgg tttgccatcg 60

```



```

ttttgctggt gtcctcactc atggccatgt gggagctgga gaaagacgtt tatgtttag 120
aggtggactg gactcccgat gccctggag aaacagttaa cctcacctgt gacacgcctg 180
aagaagatga catcacctgg acctcagacc agagacatgg agtcataggc tctggaaaga 240
ccctgacat cactgtcaaa gagtttctag atgctggcca gtacacctgc cacaaaggag 300
gcgagactct gagccactca catctgctgc tccacaagaa ggaaaatgga atttggcca 360
ctgaaatfff aaaaaatttc aaaaacaaga ctttctgaa gtgtgaagca ccaaattact 420
ccggacggtt cacgtgctca tggctgggtc aaagaaacat ggacttgaag ttcaacatca 480
agagcagtag cagttcccct gactctcggg cagtgcacat tggaatggcg tctctgtctg 540
cagagaaggt cacactggac caaagggact atgagaagta ttcagtgtcc tgccaggagg 600
atgtcacctg cccaactgcc gaggagacc tgccattga actggcgttg gaagcacggc 660
agcagaataa atatgagaac tacagacca gcttcttcat caggacatc atcaaaccag 720
acccgcccaa gaacttgag atgaagcctt tgaagaactc acaggtggag gtcagctggg 780
agtaccctga ctctggagc actcccatt cctacttctc cctcaagtc tttgttcgaa 840
tccagcgcaa gaaagaaaag atgaaggaga cagaggagg gtgtaaccag aaaggtgcgt 900
tctctgtaga gaagacatct accgaagtcc aatgcaaagg cgggaatgtc tgcgtgcaag 960
ctcaggatcg ctattacaat tctcatgca gcaagtgggc atgtgtccc tgcagggtcc 1020
gatccccggg aaaagcacc gcccgctcac ccataattgt taccggcct tggaaagcatg 1080
tagaggccat caaagaagcc ctaaactcc tggatgacat gcctgtcacg ttgaatgaag 1140
aggtagaagt cgtctctaac gagttctcct tcaagaagct aacatgtgtg cagaccgcc 1200
tgaagatatt cgagcagggt ctacggggca atttcacaa actcaagggc gccttgaaca 1260
tgacagccag ctactaccag acatactgcc cccaactcc gaaacggac tgtgaaacac 1320
aagttaccac ctatgcggat tcatagaca gccttaaac ctttctgact gatatcccct 1380
ttgaatgcaa aaaaccaagc caaaaatga 1409

```

<210> 4

<211> 1389

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 p40-IL-2 融合蛋白编码序列

<400> 4

```

atgtgtcacc agcagttggt catctcttgg tttccctgg ttttctggc atctcccctc 60
gtggccatat gggaactgaa gaaagatgtt tatgtcttag aattggattg gtatccggat 120
gccctggag aaatggtggt cctcacctgt gacaccctg aagaagatgg tatcacctgg 180
accttgacc agagcagtga ggtcttaggc tctggcaaaa cctgacat ccaagtcaaa 240
gagttggag atgctggcca gtacacctgt cacaaaggag gcgaggttct aagccattcg 300
ctctgtctgc ttcacaaaaa ggaagatgga atttggcca ctgatattt aaaggaccag 360
aaagaacca aaaaatagac ctttctaaga tgcgaggcca agaattatc tggacgttc 420
acctgctggt ggctgacgac aatcagtact gatttgacat tcagtgtcaa aagcagcaga 480
ggctcttctg accccaagg ggtgacgtgc ggagctgcta cactctctgc agagagatc 540
agaggggaca acaaggagta tgagtactca gtggagtgcc aggaggacag tgcctgcca 600
gctgctgagg agagtctgcc cattgaggtc atggtggatg cgttcacaa gctcaagtat 660

```

```

gaaaactaca ccagcagcctt cttcatcagg gacatcatca aacctgacct acccaagaac 720
ttgcagctga agccattaaa gaattctcgg caggtaggagg tcagctggga gtaccctgac 780
acctggagta ctccacattc ctacttctcc ctgacattct gcgttcaggt ccagggaag 840
agcaagagag aaaagaaaga tagagtcctc acggacaaga cctcagccac ggtcatctgc 900
cgcaaaaatg ccagcattag cgtgcgggcc caggaccgct actatagctc atcttggagc 960
gaatgggcat ctgtgccctg cagtgcacct acttcaagtt ctacaaagaa aacacagcta 1020
caactggagc atttactgct ggatttacag atgattttga atggaattaa taattacaag 1080
aatcccaaac tcaccaggat gctcacattt aagttttaca tgccaagaa ggccacagaa 1140
ctgaaacatc ttcagtgtct agaagaagaa ctcaaaccctc tggaggaagt gctaaattta 1200
gctcaaagca aaaactttca cttaagacc aggacttaa tcagcaatat caacgtaata 1260
gttctggaac taaagggatc tgaacaaca ttcatgtgtg aatatgctga tgagacagca 1320
accattgtag aatttctgaa cagatggatt acctttgtc aaagcatcat ctcaacacta 1380
acttgataa 1389

```

<210> 5

<211> 1278

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 小鼠 Fc-p35 融合蛋白编码序列

<400> 5

```

gagcccagag ggcccacaat caagccctgt cctccatgca aatgccagc acctaacctc 60
ttgggtggac catcogtctt catcttccct ccaaagatca aggatgtact catgatctcc 120
ctgagcccca tagtcacatg tgtgggtgtg gatgtgagcg aggatgacct agatgtccag 180
atcagctggi ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag 240
gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt gccctcccca tccagcacca ggactggatg 300
agtggcaagg agttcaaag caaggtcaac aacaaagacc tcccagcgcc catcgagaga 360
accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tataatgtctt gcctccacca 420
gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact ctgacctgca tggtcacaga ctatcatgct 480
gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacact 540
gaaccagtcc tggactctga tggttcttac ttcatgtaca gcaagctgag agtggaaaag 600
aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tgttcagtgg tccacgaggg tctgcacaat 660
caccacacga ctaagagctt ctcccggacc cgggtaggg tcattccagt ctctggacct 720
gccagggtgc ttagccagtc ccgaaacctg ctgaagacca cagatgacat ggtgaagacg 780
gccagagaaa aactgaaaca ttattcctgc actgctgaag acatcgatca tgaagacatc 840
acacgggacc aaaccagcac attgaagacc tgtttaccac tggaaactaca caagaacgag 900
agttgcctgg ctactagaga gacttcttcc acaacaagag ggagctgcct gccccacag 960
aagacgtctt tgatgatgac cctgtgcctt ggtagcatct atgaggactt gaagatgtac 1020
cagacagagt tccaggccat caacgcagca cttcagaatc acaaccatca gcagatcatt 1080
ctagacaagg gcatgctggt ggccatcgat gagctgatgc agtctctgaa tcataatggc 1140
gagactctgc gccagaaacc tcctgtggga gaagcagacc ctacagagt gaaaatgaag 1200
ctctgcatcc tgcttcacgc cttcagcacc cgcgtcgtga ccatcaacag ggtgatgggc 1260

```

tatctgagct ccgcctga

1278

<210> 6

<211> 1287

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人 Fc-p35 融合蛋白编码序列

<400> 6

```

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 60
gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacagggtg acaccctgcc cccatcacgg 420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgaigc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtccccg ggaagaaacc tccccgtggc cactccagac 720
ccaggaaatg tcccatgcct tcaccactcc caaaacctgc tgagggccgt cagcaaatg 780
ctccagaagg ccagacaaac tctagaattt tacccttgca ctctgaaga gattgatcat 840
gaagatatca caaagataa aaccagcaca gtggaggcct gttaccatt ggaattaacc 900
aagaatgaga gttgcctaaa ttccagagag acctcttca taactaatgg gagttgcctg 960
gcctccagaa agacctctt tatgatggcc ctgtgcctta gtagtatta tgaagacttg 1020
augatgtacc aggtggagtt caagaccatg aatgcaaagc ttctgatgga tcctaagagg 1080
cagatcttct tagatcaaaa catgctggca gttattgatg agctgatgca ggccctgaat 1140
ttcaacagtg agactgtgcc acaaaaaatcc tcccttgaag aaccggattt ttataaaact 1200
aaaatcaagc tctgatact tcttcatgct tcagaattc gggcagtgac tattgacaga 1260
gtgacgagct atctgaatgc ttcctaa 1287

```

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于构建小鼠 p40-IL-2 融合蛋白的正向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> (12)..(14)

<223> 翻译起始密码子

<400> 7

aagctagcac catgtgtcct cagaagctaa cc

32

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于构建小鼠 p40-IL-2 融合蛋白的反向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> 互补物(complement)((7)..(9))

<223> 翻译终止密码子

<400> 8

ctcgagctag gatcggaccc tgcaggg

27

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 小鼠 p40-IL-2 融合蛋白连接处的 DNA 序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (14)..(16)

<223> 编码小鼠 p40 的 C 端氨基酸残基

<220>

<221> 其它特征

<222> (26)..(28)

<223> 编码成熟小鼠 IL-2 的 N 端氨基酸残基

<400> 9

ctgcagggtc cgatccccgg gtaaagcacc c

31

<210> 10

<211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 在单链小鼠 IL12 和 GMCSF 连接处的 DNA 序列

<220>  
 <221> 其它特征  
 <222> (14)..(16)  
 <223> 编码小鼠 p40 的 C 端氨基酸残基

<220>  
 <221> 其它特征  
 <222> (26)..(28)  
 <223> 编码成熟小鼠 GMCSF 的 N 端氨基酸残基

<400> 10  
 ctgcagggtc cgatccccgg gaaaagca

28

<210> 11  
 <211> 2013  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 小鼠 p35-接头-p40-IL-2 融合蛋白编码序列

<400> 11  
 agggtcattc cagtctctgg acctgccagg tgccttagcc agtcccga cctgctgaag 60  
 accacagatg acatgggtga gacggccaga gaaaaactga aacattattc ctgcactgct 120  
 gaagacatcg atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca gcacattgaa gacctgttta 180  
 ccaactggaac tacacaagaa cgagagttgc ctggctacta gagagacttc ttccacaaca 240  
 agaggagct gcctgcccc acagaagacg tctttgatga tgaccctgtg ccttggtagc 300  
 atctatgagg acttgaagat gtaccagaca gaggctcagg ccatcaacgc agcacttcag 360  
 aatcacaacc atcagcagat cattctagac aaggcctatg tggtggccat cgatgagctg 420  
 atgcagtctc tgaatcataa tggcgagact ctgcgccaga aacctcctgt gggagaagca 480  
 gacccttaca gaggtaaaat gaagctctgc atcctgcttc acgccttcag caccgcgctc 540  
 gtgaccatca acagggtgat gggctatctg agctccgctg cgagcggggg cagcgggggc 600  
 ggaggcagcg gcggggggcg atccgccatg tgggtgctgg agaaagacgt ttatgttga 660  
 gaggtggact ggactccca tgcccctgga gaaacagtga acctcacctg tgacacgcct 720  
 gaagaagatg acatcacctg gaccicagac cagagacatg gaggcatagg ctctggaaag 780  
 accctgacca tcaactgcaa agagtttcta gatgctggcc agtacacctg ccacaaagga 840  
 ggcgagactc tgagccactc acatctgctg ctccacaaga aggaaaatgg aatttggctc 900

```

actgaaattt taaaaattt caaaaaaag actttcctga agtgtgaagc accaaattac 960
tccggacggt tcacgtgctc atggctgggt caaagaaaca tggacttgaa gttcaacatc 1020
aagagcagta gcagttcccc tgactctcgg gcagtgacat gtggaatggc gtctctgtct 1080
gcagagaagg tcacactgga ccaaaggac tatgagaagt attcagtgtc ctgccaggag 1140
gatgtcacct gcccaactgc cgaggagacc ctgccattg aactggcgtt ggaagcacgg 1200
cagcagaata aatatgagaa ctacagcacc agcttcttca tcaggacat catcaaacca 1260
gacccgccca agaacttgca gatgaagcct ttgaagaact cacagtgga ggtcagctgg 1320
gagtaccctg actcctggag cactcccat tcctacttct ccctcaagt cttgttcga 1380
atccagcgca agaaagaaaa gatgaaggag acagaggagg ggtgtaacca gaaaggtgcg 1440
ttcctcgtag agaagacatc taccgaagtc caatgcaaag gcggaatgt ctgcgtgcaa 1500
gtcaggatc gctattaca ttctcatgc agcaagtggg catgtgttcc ctgcagggtc 1560
cgatccccgg gtaaagcacc cacttcaagc tctacagcgg aagcacagca gcagcagcag 1620
cagcagcagc agcagcagca gcacctggag cagctgttga tggacctaca ggagctcctg 1680
agcaggatgg agaattacag gaacctgaaa ctccccagga tgctcacctt caaattttac 1740
ttgcccaagc aggccacaga attgaaagat cttcagtgcc tagaagatga acttggacct 1800
ctgcggcatg ttctggattt gactcaaagc aaaagcttcc aattggaaga tgctgagaat 1860
ttcatcagca atatcagagt aactgttcta aaactaaagg gctctgacaa cacatttgag 1920
tgccaattcg atgatgagtc agcaactgtg gtggacttcc tgaggagatg gatagccttc 1980
tgtcaaagca tcattcctcaac aagccctcaa taa 2013

```

<210> 12

<211> 1569

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 小鼠 p35-接头-p40 融合蛋白编码序列

<400> 12

```

agggtcattc cagtcctctg acctgccagg tgtcttagcc agtcccga cctgctgaag 60
accacagatg acatgggtga gacggccaga gaaaaactga aacattatc ctgcactgct 120
gaagacatcg atcatgaaga catcacacgg gaccaaacca gcacattgaa gacctgttta 180
ccactggaac tacacaagaa cgagagttgc ctggctacta gagagacttc ttccacaaca 240
agagggagct gcctgcccc acagaagacg tctttagatga tgacctgtg ccttggtagc 300
atctatgagg acttgaagat gtaccagaca gagtccagg ccatcaacgc agcacttcag 360
aatcacaacc atcagcagat cattctagac aaggcctgctc tgggtggccat cgatgagctg 420
atgcagtctc tgaatcataa tggcgagact ctgcgccaga aacctcctgt gggagaagca 480
gaccttaca gagtgaatat gaagctctgc atcctgcttc acgccttcag caccgcgtc 540
gtgaccatca acagggatg gggctatctg agctccgctg cgagcggggg cagcgggggc 600
ggaggcagcg gcggggcg atccgccatg tgggtgctgg agaaagacgt ttatgttcta 660
gaggtggact ggactccga tgcccctgga gaaacagtga acctcacctg tgacacgcct 720
gaagaagatg acatcacctg gacctcagac cagagacatg gagtcatagg ctctggaag 780
accctgacca tcactgtcaa agagtttcta gatgtggtcc agtacacctg ccacaaagga 840
ggcgagactc tgagccactc acatctgctg ctccacaaga aggaaaatgg aatttggctc 900

```

```

actgaaattt taaaaattt caaaaacaag actttcctga agtgtgaagc accaaattac 960
tccggacggt tcacgtgctc atggctgggtg caaagaaaca tggacttgaa gttcaacatc 1020
aagagcagta gcagttcccc tgactctcgg gcagtgacat gtggaatggc gtctctgtct 1080
gcagagaagg tcacactgga ccaaaaggac tatgagaagt attcagtgtc ctgccaggag 1140
gatgtcacct gcccaactgc cgaggagacc ctgcccattg aactggcgtt ggaagcacgg 1200
cagcagaata aatatgagaa ctacagcacc agcttcttca tcagggacat catcaaacca 1260
gaccgcccc aagaacttgca gatgaagcct ttgaagaact cacaggtgga ggtcagctgg 1320
gagtaccctg actcctggag cactcccat tcctacttct ccctcaagtt cttgttctga 1380
atccagcgca agaaagaaaa gatgaaggag acagaggagg ggtgtaacca gaaaggtgcg 1440
ttcctcgtag agaagacatc taccgaagtc caatgcaaag gcgggaatgt ctgcgtgcaa 1500
gctcaggatc gctattacaa ttctcatgc agcaagtggg catgtgttcc ctgcagggtc 1560
cgatcctag 1569

```

<210> 13

<211> 2709

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:小鼠 Fc-p35-接头-p40-IL-2 融合蛋白编码序列

<400> 13

```

gagcccagag ggcccacaat caagccctgt cctccatgca aatgccagc acctaaccctc 60
ttgggtggac catcctctt catcttccct ccaaagatca aggatgtact catgatctcc 120
ctgagcccca tagtcacatg tgtggtgggtg gatgtgagcg aggatgacc agatgtccag 180
atcagctggt ttgtgaacaa cgtggaagta cacacagctc agacacaaac ccatagagag 240
gattacaaca gtactctccg ggtggtcagt gccctccca tccagcacca ggactggatg 300
agtggaagg agttcaaatg caaggtcaac acaaaagacc tcccagcgcc catcgagaga 360
accatctcaa aacccaaagg gtcagtaaga gctccacagg tatagtctt gcctccacca 420
gaagaagaga tgactaagaa acaggtcact ctgacctgca tggtcacaga cttcatgcct 480
gaagacattt acgtggagtg gaccaacaac gggaaaacag agctaaacta caagaacct 540
gaaccagtcc tggactctga tggttcttac ttcatgtaca gcaagctgag agtggaaaag 600
aagaactggg tggaaagaaa tagctactcc tgttcagtgg tccacgaggg tctgcacaa 660
caccacacga ctaagagctt ctccgggacc cgggtaggg tcattccagt ctctggacct 720
gccagggtgc ttagccagtc ccgaaacctg ctgaagacca cagatgacat ggtgaagacg 780
gccagagaaa aactgaaaca ttattcctgc actgctgaag acatcgatca tgaagacatc 840
acacgggacc aaaccagcac attgaagacc tgtttaccac tggaaactaca caagaacgag 900
agttgcctgg ctactagaga gacttcttcc acaacaagag ggagctgcct gccccacag 960
aagacgtctt tgatgatgac cctgtgcctt ggtagcatct atgaggactt gaagatgtac 1020
cagacagagt tccaggccat caacgcagca cttcagaatc acaacctca gcagatcatt 1080
ctagacaagg gcatgctggt ggccatcgat gagctgatgc agtctctgaa tcataatggc 1140
gagactctgc gccagaaacc tcctgtggga gaagcagacc cttacagagt gaaaatgaag 1200
ctctgcatcc tgcctcacgc cttcagcacc cgcgtcgtga ccatcaacag ggtgatgggc 1260
tatctgagct ccgctcgag cggggcgagc gggggcggag gcagcggcgg gggcggatcc 1320

```

```

gccatgtggg tgctggagaa agacgtttat gttgtagagg tggactggac tcccgatgcc 1380
cctggagaaa cagtgaacct cacctgtgac acgcctgaag aagatgacat cacctggacc 1440
tcagaccaga gacatggagt cataggctct ggaaagaccc tgaccatcac tgtcaaagag 1500
tttctagatg ctggccagta cacctgccac aaaggaggcg agactctgag ccactcacat 1560
ctgctgctcc acaagaagga aaatggaatt tggctcactg aaattttaa aaatttcaa 1620
aacaagactt tcctgaagtg tgaagcacca aattactcog gacggttcac gtgctcatgg 1680
ctggtgcaaa gaaacatgga cttgaagttc aacatcaaga gcagtagcag tccccctgac 1740
tctcgggcag tgacatgtgg aatggcgtct ctgtctgcag agaaggtcac actggaccaa 1800
agggactatg agaagtattc agtgcctgc caggaggatg tcacctgccc aactgccgag 1860
gagaccctgc ccattgaact ggcgttgaa gcacggcagc agaataaata tgagaactac 1920
agcaccagct tcttcatcag ggacatcatc aaaccagacc cgccaagaa cttgcagatg 1980
aagcctttga agaactcaca ggtggaggtc agctgggagt acctgactc ctggagcact 2040
ccccattcct acttctcct caagttctt gttcgaatcc agcgcaagaa agaaaagatg 2100
aaggagacag aggagggtg taaccagaaa ggtgcgttcc tcgtagagaa gacatctacc 2160
gaagtccaat gcaaaggcgg gaatgtctgc gtgcaagctc aggatcgcta ttacaattcc 2220
tcatgcagca agtgggatg tttccctgc aggtccgat ccccggtaa agcaccact 2280
tcaagctcia cagcggcagc acagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcac 2340
ctggagcagc tgttgatgga cctacaggag ctctgagca ggatggagaa ttacaggaac 2400
ctgaaactcc ccaggatgct caccttcaa tttacttgc ccaagcaggc cacagaattg 2460
aaagatcttc agtcctaga agatgaactt ggacctctgc ggcatgttct ggatttgact 2520
caaagcaaaa gctttcaatt ggaagatgct gagaattica tcagcaatat cagagtaact 2580
gttgtaaac taaagggtc tgacaacaca tttgagtcc aattcgatga tgagtcagca 2640
actgtggtgg acttctgag gagatggata gccttctgtc aaagcatcat ctcaacaagc 2700
cctcaataa 2709

```

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠 IL-12 p35 亚单位的正向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> (16).. (18)

<223> 翻译起始密码子

<400> 14

aagcttgcta gcagcatgtg tcaatcacgc tac

33

<210> 15

<211> 30

<212> DNA



<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠 IL-12 p35 亚单位的反向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> 互补物((10)..(12))

<223> 翻译终止密码子

<400> 15

ctcgagcttt caggcggagc tcagatagcc 30

<210> 16

<211> 61

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 包含小鼠单链 IL-12 的 p35 和 p40 连接处的编码序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (8)..(10)

<223> 编码小鼠 p35 的 C 端氨基酸残基

<220>

<221> 其它特征

<222> (59)..(61)

<223> 编码成熟小鼠 p40 的 N 端氨基酸残基

<400> 16

gagctccgcg tcgagcgggg gcagcggggg cggaggcagc ggcgggggccc gatccgccat 60  
g 61

<210> 17

<211> 16

<212> 蛋白

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 包含小鼠单链 IL-12 的 p35 和 p40 的连接处的蛋白序列

<400> 17

Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala  
 1 5 10 15

<210> 18  
 <211> 73  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 在小鼠 p40 和 KS 重链成熟 N 端之间连接处的编码序列

<220>  
 <221> 其它特征  
 <222> (14).. (16)  
 <223> 编码小鼠 p40 的 C 端氨基酸残基

<220>  
 <221> 其它特征  
 <222> (71).. (73)  
 <223> 编码成熟 KS 重链的 N 端残基

<400> 18  
 ctgcagggtc cgatccccgg gatccggagg ttcagggggc ggaggtagcg gcggaggggg 60  
 ctccttaagc cag 73

<210> 19  
 <211> 18  
 <212> 蛋白  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 在小鼠 p40 和 KS 重链成熟 N 端之间连接处的蛋白序列

<400> 19  
 Pro Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

Leu Ser

<210> 20  
 <211> 64  
 <212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 在小鼠 p35 和 KS 轻链之间连接处的编码序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (8)..(10)

<223> 编码小鼠 p35 的 C 端氨基酸残基

<220>

<221> 其它特征

<222> (62)..(64)

<223> 编码轻链的 N 端氨基酸残基

<400> 20

```
gagctccgcg tcgagcgggg gcagcggggg cggaggcagc ggccggggcg gatccttaag 60
cgag                                             64
```

<210> 21

<211> 17

<212> 蛋白

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 在小鼠 p35 和 KS 轻链连接处的蛋白序列

<400> 21

```
Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu
  1           5           10           15
```

Ser

<210> 22

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠 IL-4 的正向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> (9)..(11)

<223> 翻译起始密码子

<400> 22

tctagaccat gggctctcaac ccccagc

27

<210> 23

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠 IL-4 的反向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> 互补物((8)..(10))

<223> 编码小鼠 IL-4 的 C 端氨基酸残基

<400> 23

cggatcccga gtaatccatt tgcattgatgc tcttaggct ttccagg

47

<210> 24

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 在小鼠 IL-4 和成熟 KS-1/4 轻链的连接处的编码序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(3)

<223> 编码小鼠 IL-4 的 C 端丝氨酸残基

<220>

<221> 其它特征

<222> (55)..(57)

<223> 编码成熟 KS-1/4 轻链的 N 端氨基酸残基

<400> 24

tcgggatccg gaggttcagg gggcggaggc agcggcggag ggggctcctt aagcgag

57

<210> 25

<211> 19  
 <212> 蛋白  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 在小鼠 IL-4 和成熟 KS-1/4 轻链连接处的蛋白序列

<400> 25

Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

Leu Ser Glu

<210> 26  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠 IL-4 的正向引物

<220>

<221> 其它特征  
 <222> (9)..(11)  
 <223> 翻译起始密码子

<400> 26

tctagacat gggctctcaac ccccgagc

27

<210> 27  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠 IL-4 的反向引物

<220>

<221> 其它特征  
 <222> 互补物((13)..(15))  
 <223> 编码小鼠 IL-4 的 C 端氨基酸残基

<400> 27

cgatatcccg gacgagtaat ccatttgcat gatgctcttt aggctttcca gg 52

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 在小鼠 IL-4 和小鼠 GM-CSF 之间连接处的编码序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1).. (12)

<223> 编码 muIL4 的 C 端序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (28).. (39)

<223> 编码 muGM-CSF 的 N 端序列

<400> 28

atggattact cgtccgggat gggaaaagca cccgcccgc 39

<210> 29

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠淋巴趋化因子的正向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> (13).. (15)

<223> 翻译起始密码子

<400> 29

tctagagcca ccatgagact tctcctcctg ac 32

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 用于 PCR 扩增小鼠淋巴趋化因子的反向引物

<220>

<221> 其它特征

<222> 互补物 ((7).. (9))

<223> 编码小鼠淋巴趋化因子的 C 端氨基酸残基

<400> 30

ggatccccca gtcagggtta ctgctg

26

<210> 31

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 在小鼠淋巴趋化因子和 KS-IL2 重链之间连接处的编码序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1).. (3)

<223> 编码小鼠淋巴趋化因子的 C 端氨基酸残基

<220>

<221> 其它特征

<222> (55).. (57)

<223> 编码 KS-IL2 重链的 N 端氨基酸残基

<400> 31

cccggatccg gaggttcagg gggcggaggt agcggcggag ggggctcctt aagccag

57

<210> 32

<211> 17

<212> 蛋白

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 在小鼠淋巴趋化因子和 KS-IL2 重链之间连接处的蛋白序列

<400> 32

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu

1

5

10

15

Ser

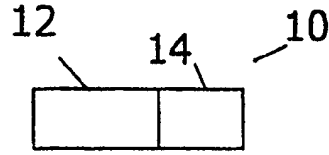


图 1A

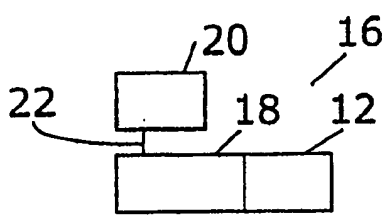


图 1B

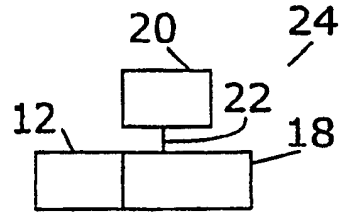


图 1C

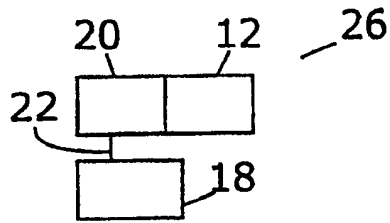


图 1D

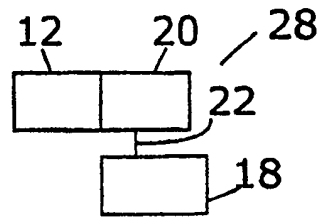


图 1E

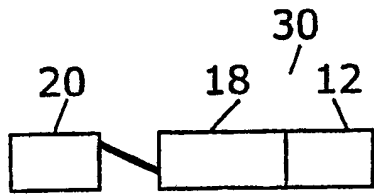


图 1F

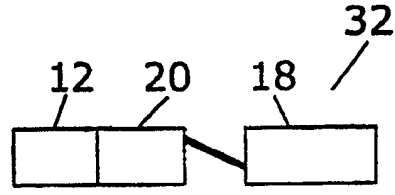


图 1G

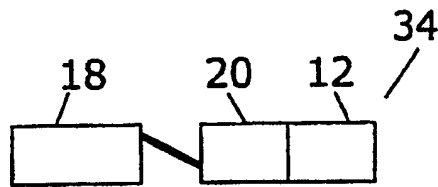


图 1H

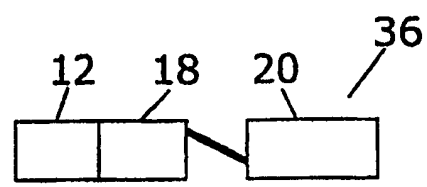


图 1I



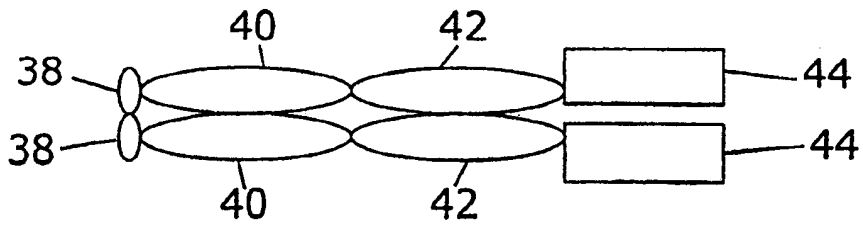


图 2A

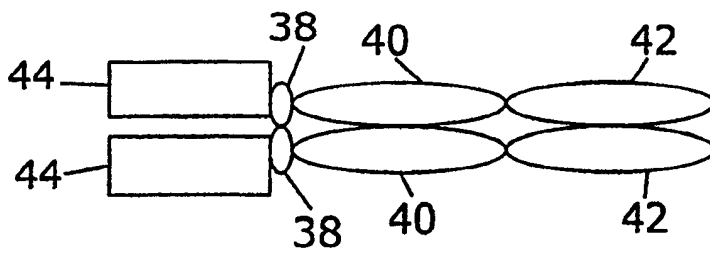


图 2B

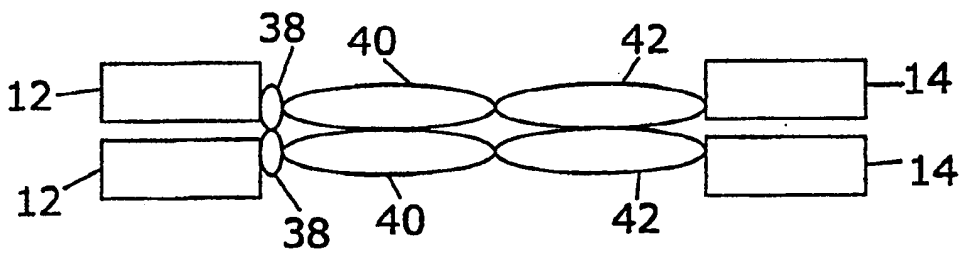


图 2C

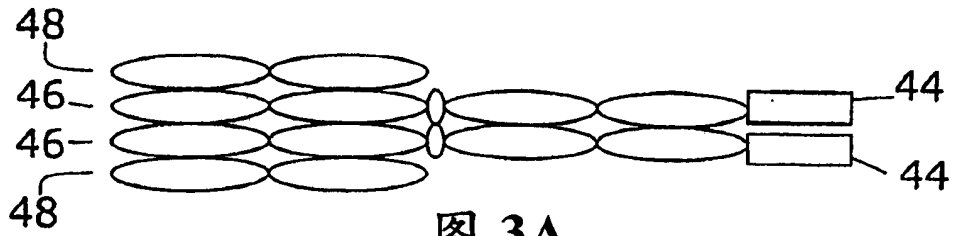


图 3A

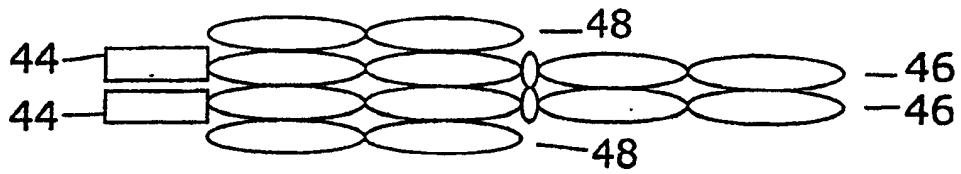


图 3B

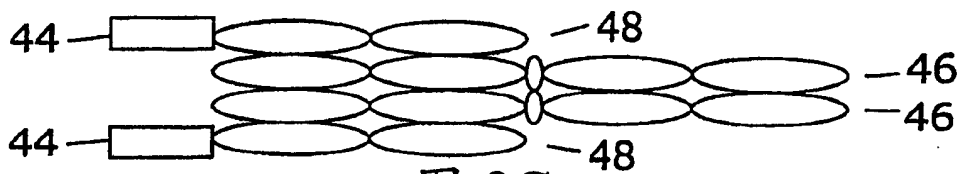


图 3C

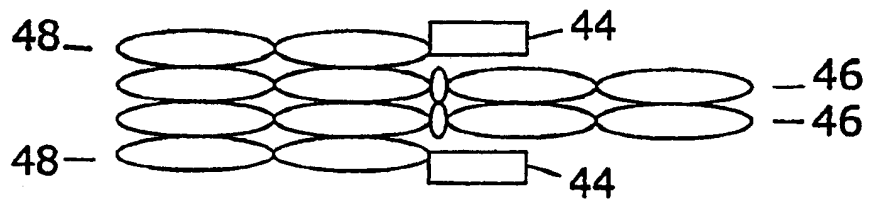


图 3D

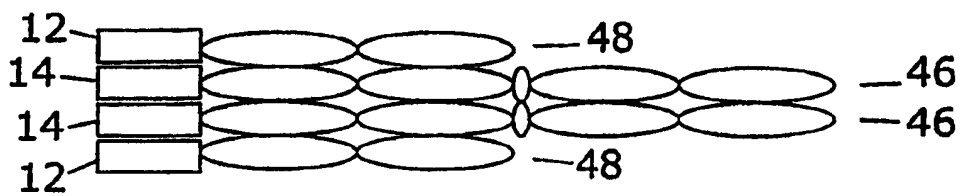


图 3E

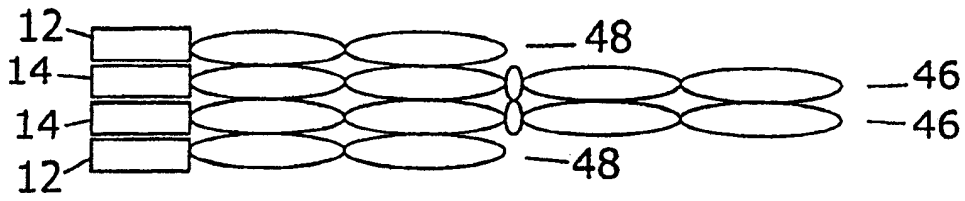


图 3E

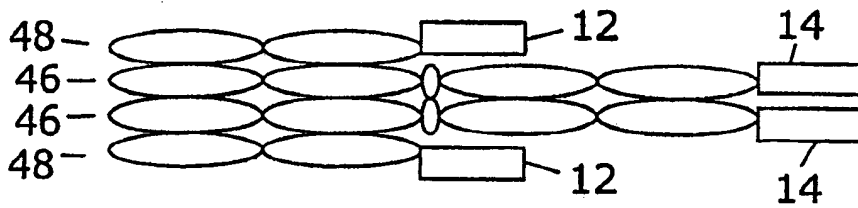


图 3F

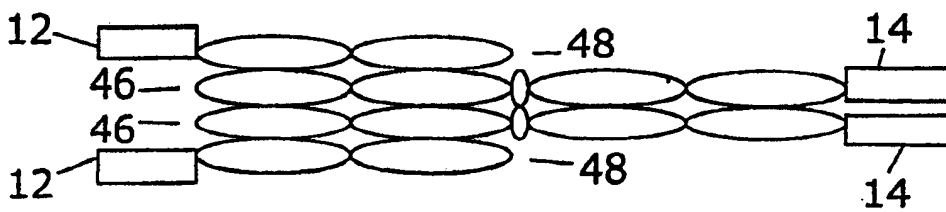


图 3G

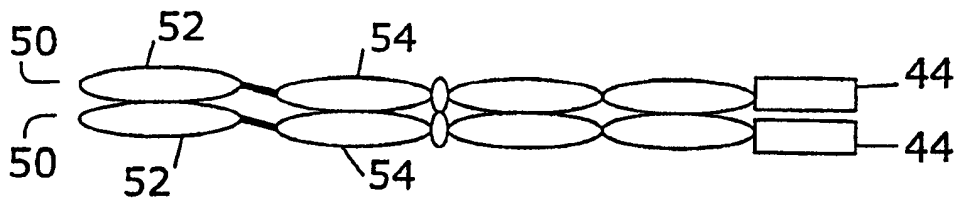


图 4A

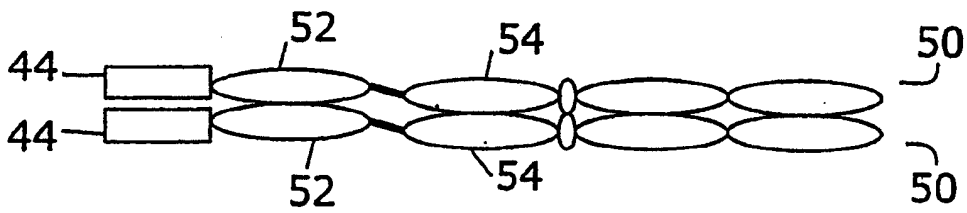


图 4B

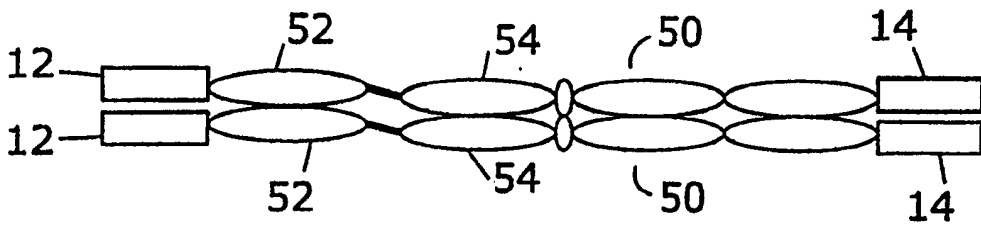


图 4C

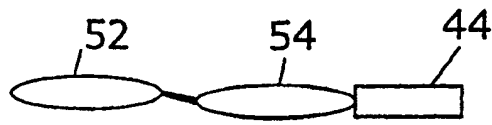


图 5A

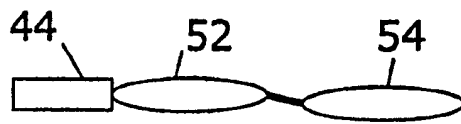


图 5B



图 5C

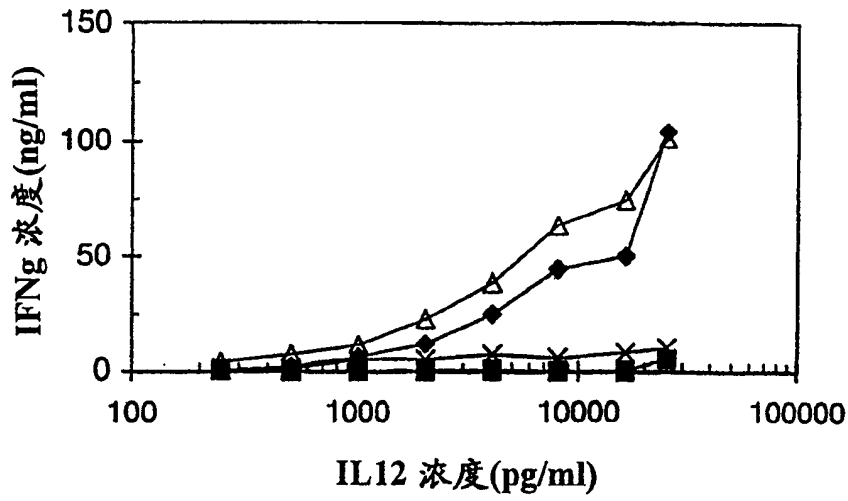


图 6A

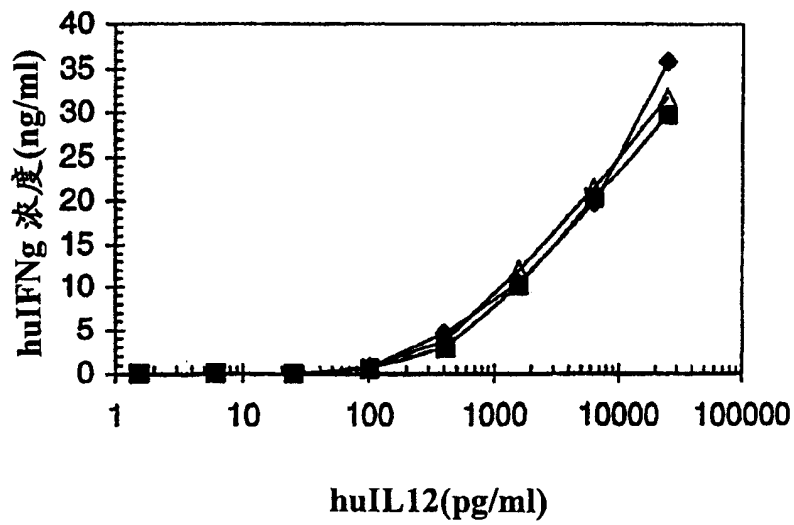


图 6B

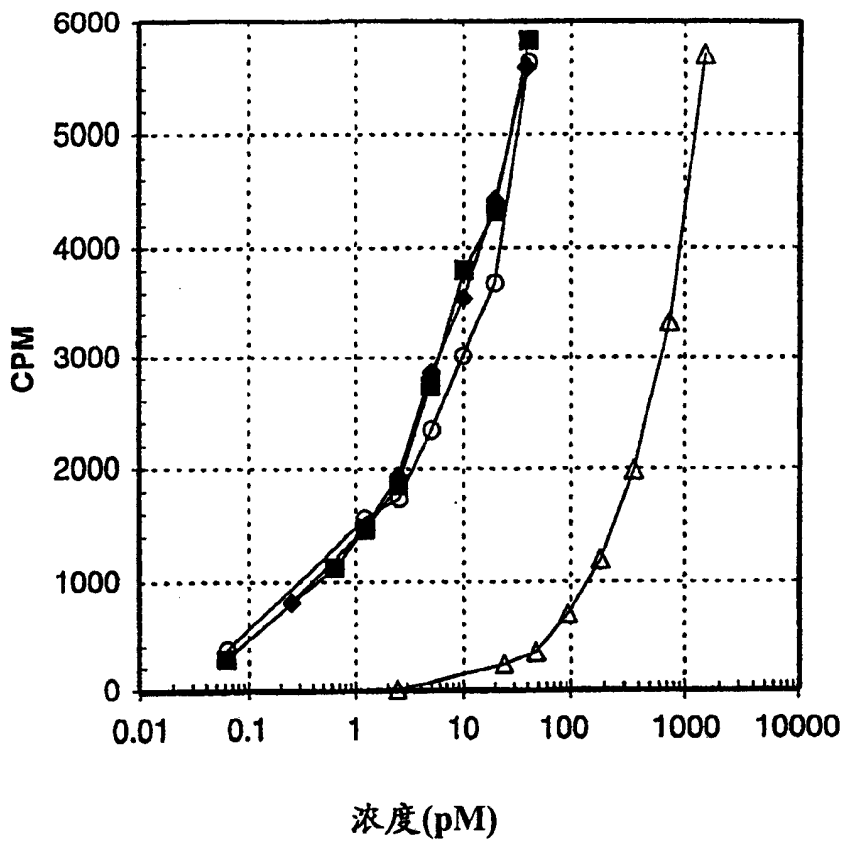


图 7

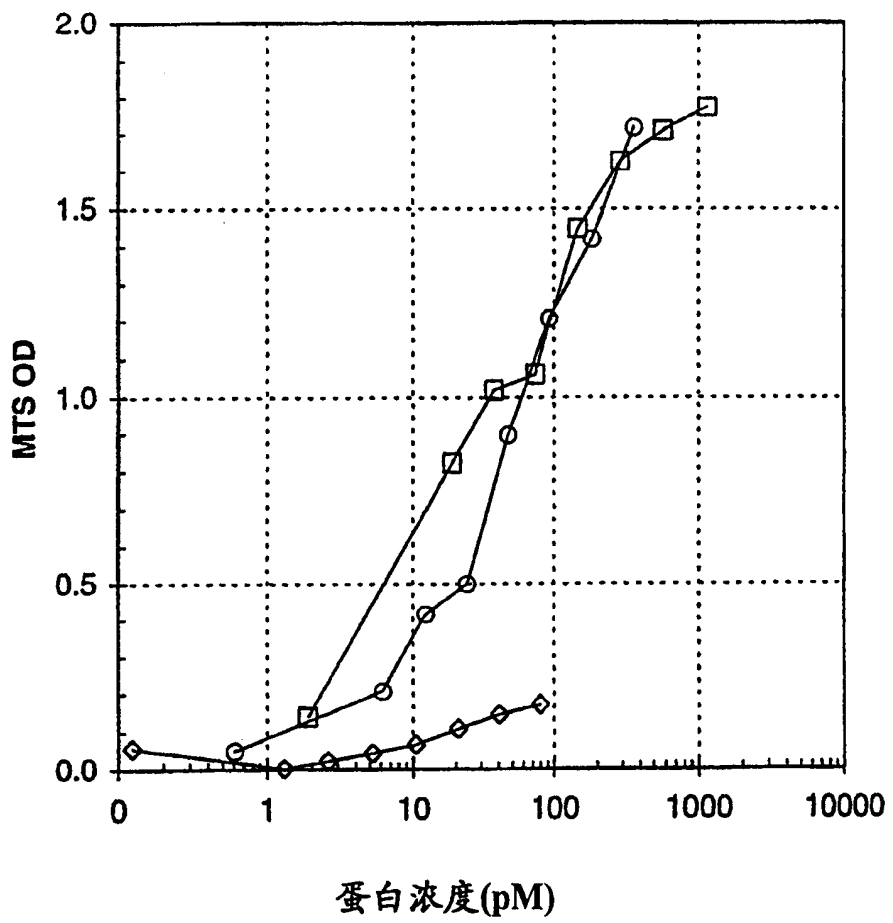


图 8



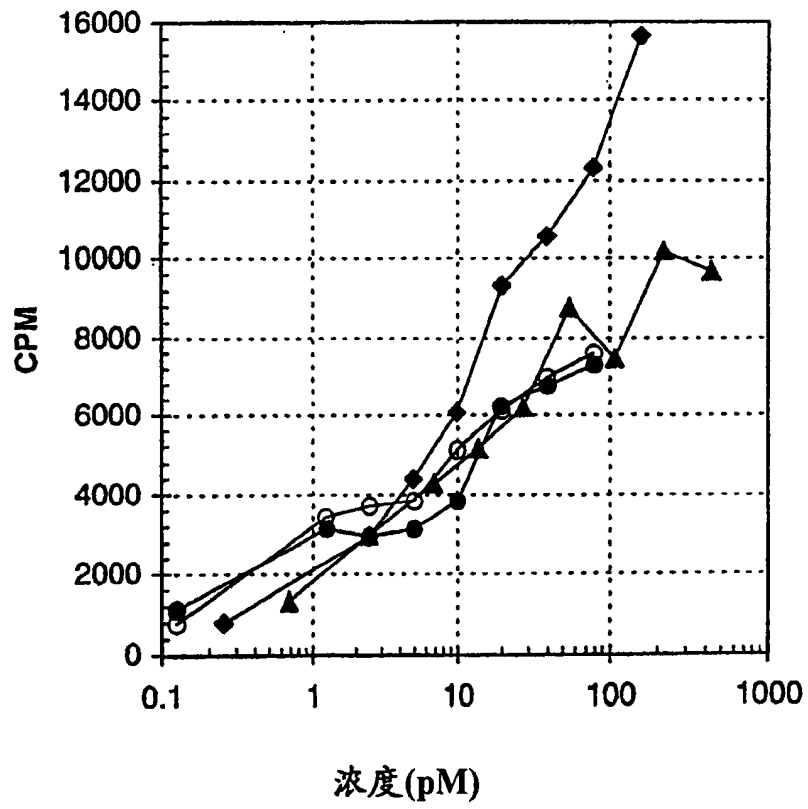


图 9

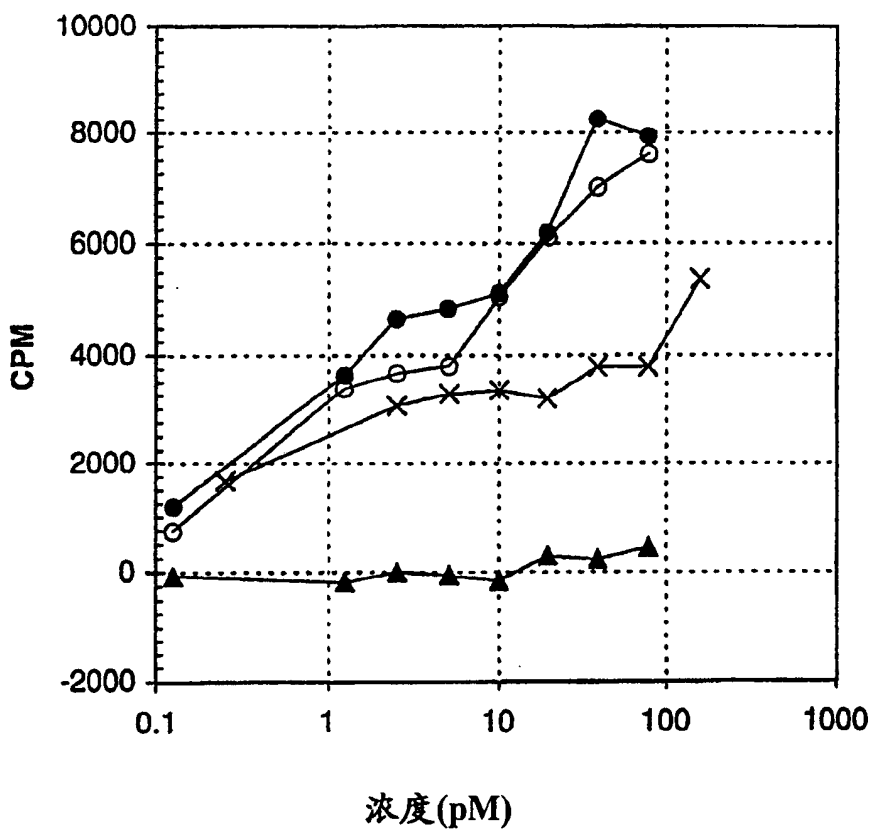


图 10

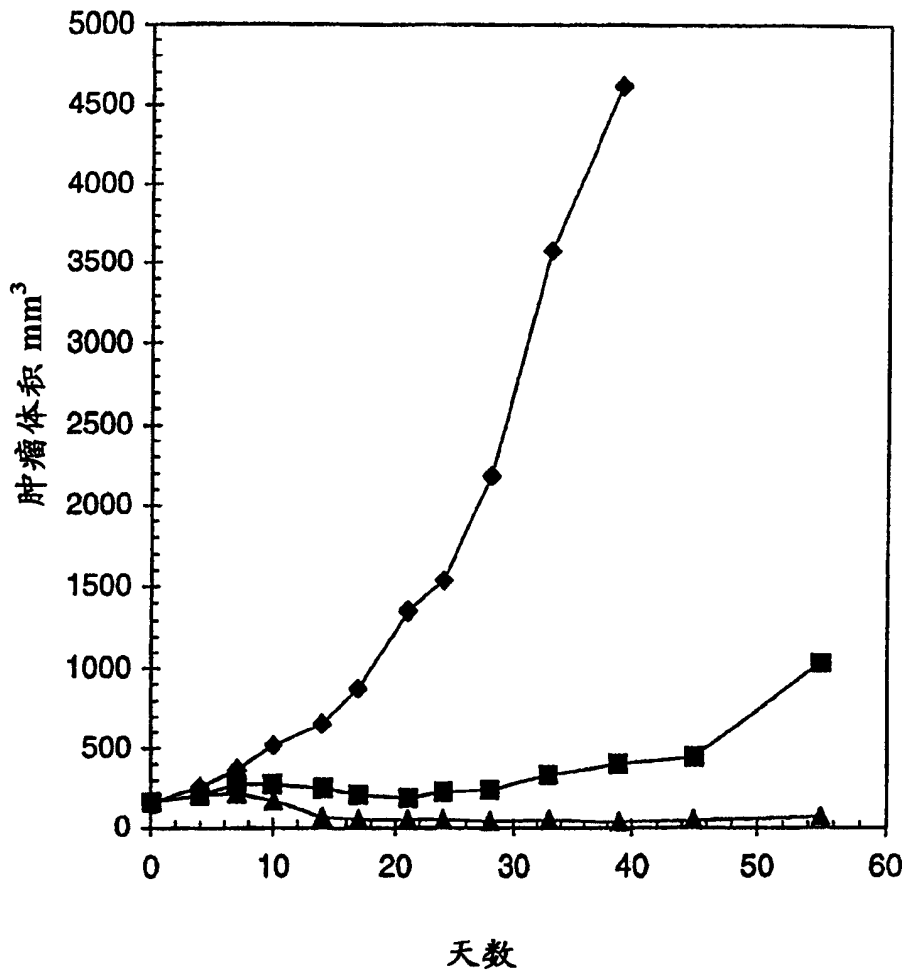


图 11

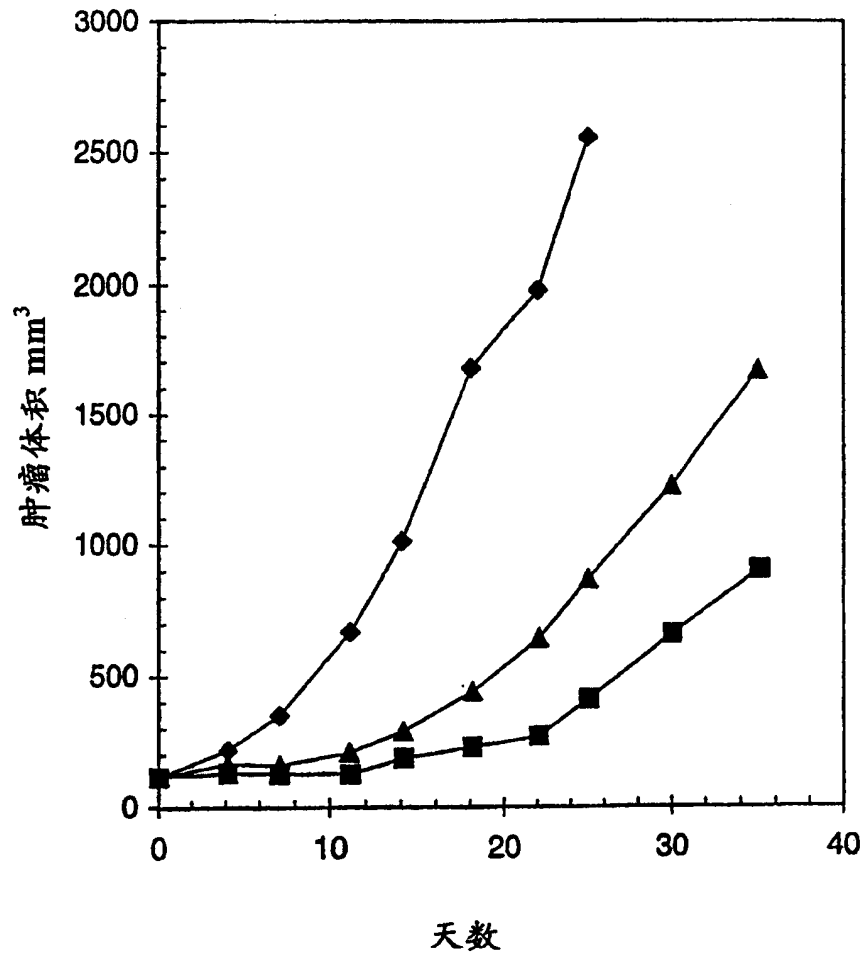


图 12

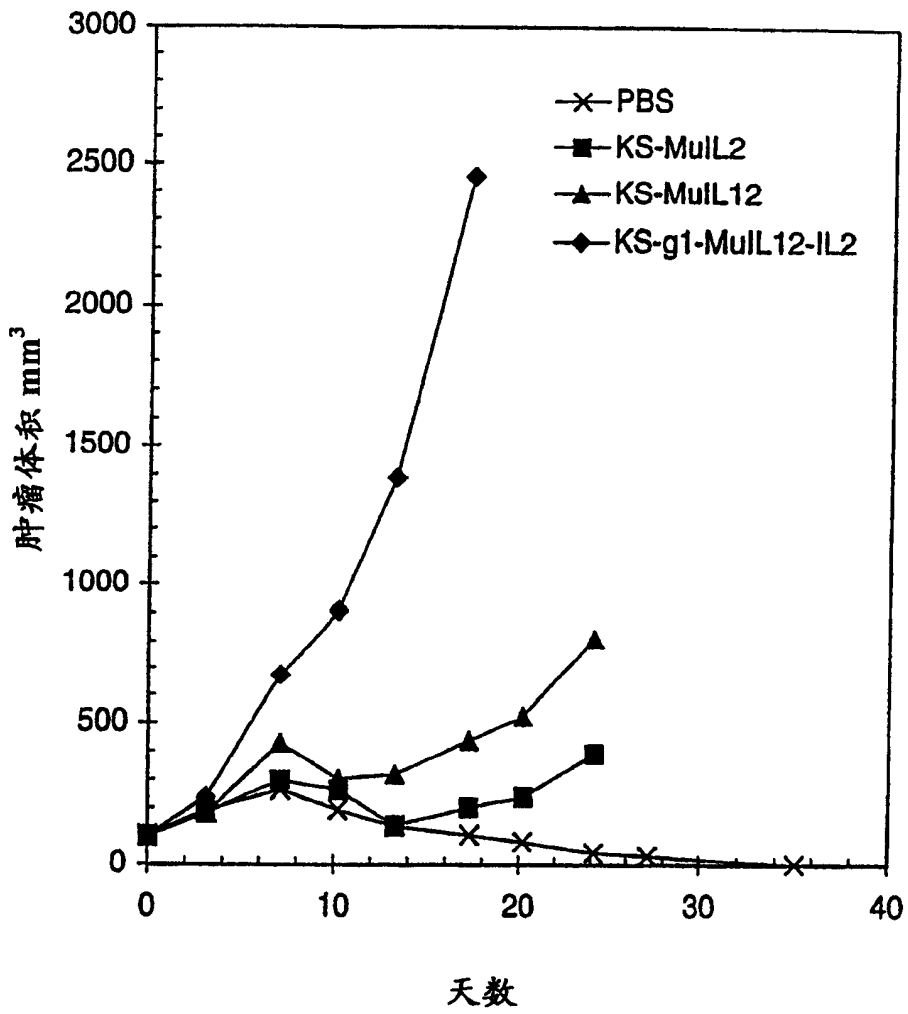


图 13

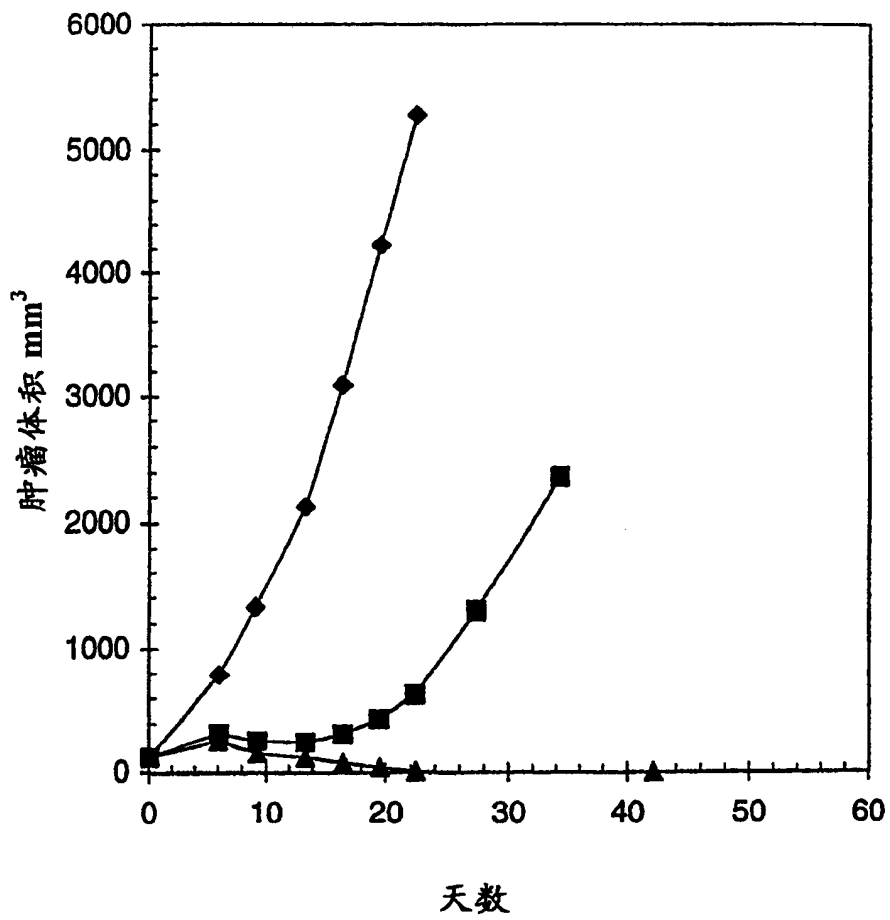


图 14

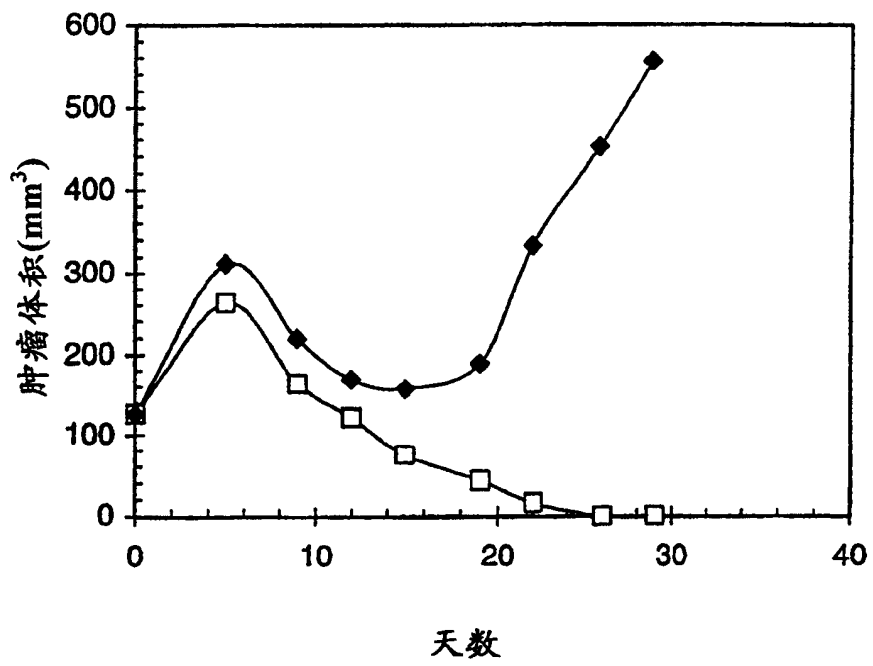


图 15

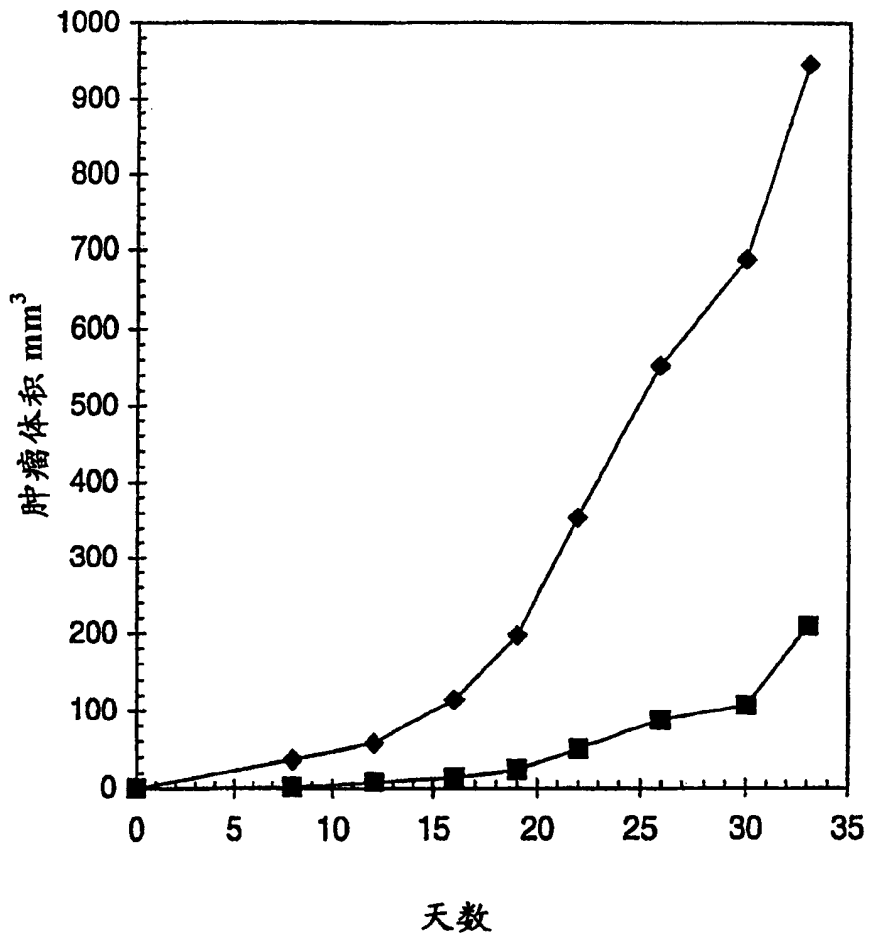


图 16



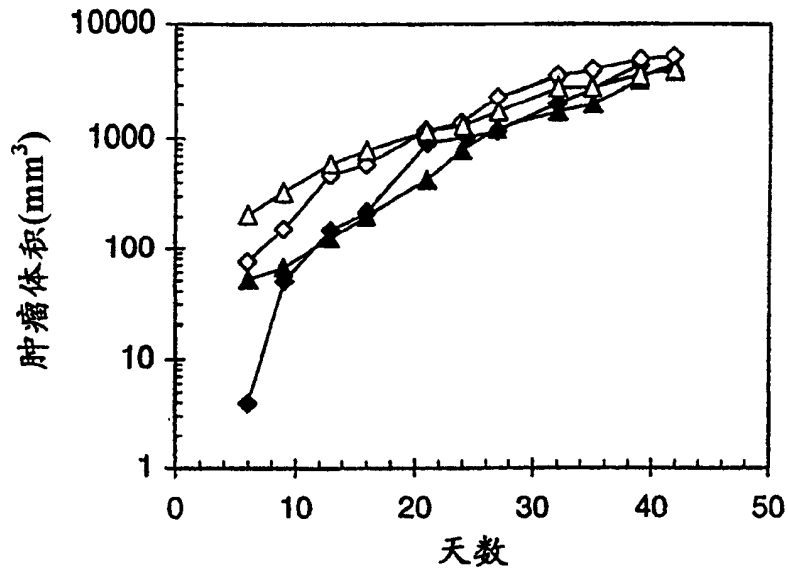


图 17A

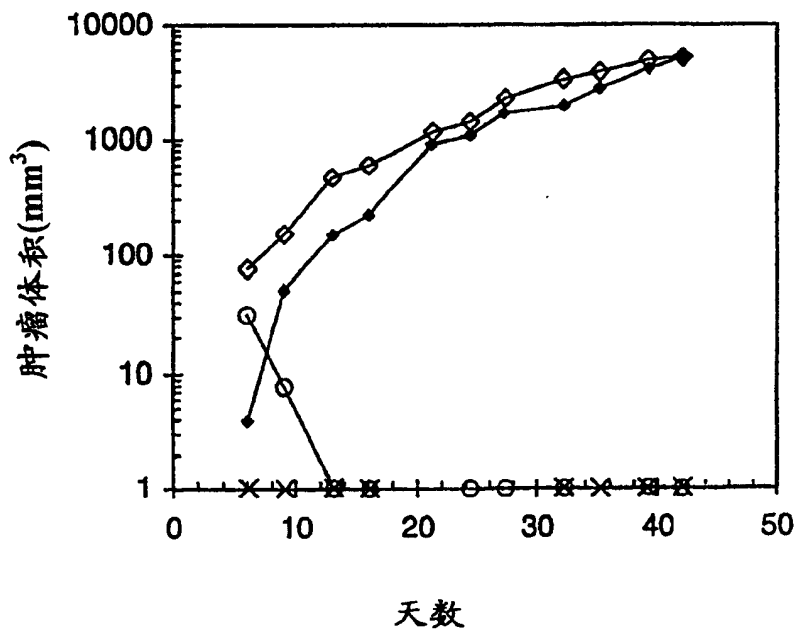


图 17B

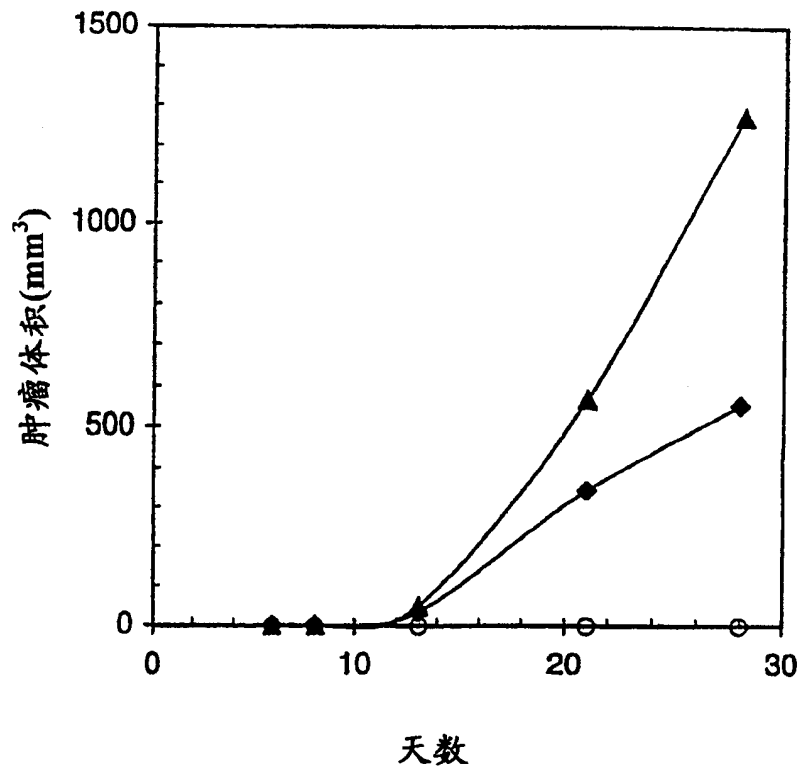


图 18